

Die Glutaryl-tRNA Reduktase aus *Escherichia coli*

Rekombinante Produktion, Enzymmechanismus und biochemische Charakterisierung

Von der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Technischen Universität Carolo-Wilhelmina
zu Braunschweig
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)
genehmigte
D i s s e r t a t i o n

von Dipl.-Chem. Stefan Schauer
aus Stitzendorf

1. Referent: Prof. Dr. D. Jahn

2. Referent: Prof. Dr. D. Heinz

eingereicht am: 17.11.2003

mündliche Prüfung (Disputation) am: 18.12.2003

Druckjahr 2004

Vorveröffentlichungen der Dissertation

Teilergebnisse aus dieser Arbeit wurden mit Genehmigung der Gemeinsamen Naturwissenschaftlichen Fakultät, vertreten durch Prof. Dr. D. Jahn, in folgenden Beiträgen vorab veröffentlicht:

Publikationen

Schauer, S., Chaturvedi, S., Randau, L., Moser, J., Kitabatake, M., Lorenz, S., Verkamp, E., Schubert, W.-D., Nakayashiki, T., Murai, M., Wall, K., Thomann, H.U., Heinz, D.W., Inokuchi, H., Söll, D. & Jahn, D. (2002). *Escherichia coli* glutamyl-tRNA reductase. *J. Biol. Chem.* **277**, 48657-48663.

Schubert, W. D., Moser, J., Schauer, S., Heinz, D. W. & Jahn, D. (2002). Structure and function of glutamyl-tRNA reductase, the first enzyme of tetrapyrrole biosynthesis in plants and prokaryotes. *Photosynthesis Research* **74**, 205-215.

Schauer, S., Lüer, C. & Moser, J. (2003). Large scale production of biologically active *Escherichia coli* glutamyl-tRNA reductase from inclusion bodies. *Protein. Expr. Purif.* **31**, 271-275.

Tagungsbeiträge

Randau, L., Schauer, S., Moser, J., Sekine, S. I., Shigeyuki, Y., Söll, D. & Jahn, D.: Different tRNA recognition by glutamyl-tRNA reductase and glutamyl-tRNA synthetase. 20th International tRNA Workshop, October 2-7, 2003, Banz, Germany.

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Tetrapyrrole	1
1.2	Synthesewege der 5-Aminolävulinsäure	1
1.3	Die Biosynthese von Tetrapyrrolen	3
1.4	Die glutamatspezifische Transfer-RNA	5
1.5	Die Glutamyl-tRNA Synthetase	6
1.6	Die Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase	7
1.7	Die Glutamyl-tRNA Reduktase	7
1.8	Zielsetzung der Arbeit	10
2	Material und Methoden	11
2.1	Chemikalien und Geräte	11
2.1.1	Geräte und Kits	11
2.1.2	Chemikalien	12
2.2	Bakterienstämme und Plasmide	13
2.2.1	Bakterienstämme	13
2.2.2	Plasmide	13
2.3	Medien und Medienzusätze	14
2.3.1	Medien	14
2.3.2	Medienzusätze	14
2.4	Mikrobiologische Techniken	15
2.4.1	Sterilisation	15
2.4.2	Bakterienkultivierung	15
2.4.3	Bestimmung von Zelldichten	15
2.5	Molekularbiologische Methoden	15
2.5.1	Herstellung elektrokompenter Zellen	15
2.5.2	Transformation von Bakterien	16
2.5.3	Plasmid-DNA-Präparation	16
2.5.4	Bestimmung der Nucleinsäure-Konzentration	16
2.5.5	Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen	16
2.5.6	Agarose-Gelelektrophorese	17
2.5.6.1	Lösungen zur Agarose Gelelektrophorese	17

2.5.7	Sequenzierung von DNA	17
2.5.8	Ortsgerichtete Mutagenese des <i>Escherichia coli hemA</i> -Gens	17
2.5.9	<i>In vivo</i> Transkription und Reinigung von <i>Escherichia coli</i> tRNA ^{Glu}	18
2.5.9.1	Zellkultur	18
2.5.9.2	Isolation der Nucleinsäuren	19
2.5.9.2.1	Lösungen zur Isolation der Nucleinsäuren	19
2.5.9.3	Chromatographische Anreicherung von tRNA ^{Glu}	19
2.5.9.3.1	Lösungen zur Chromatographischen Anreicherung von tRNA ^{Glu}	20
2.6	Proteinproduktion	20
2.6.1	Rekombinante Produktion und chromatographische Reinigung der <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Synthetase	20
2.6.1.1	Zellkultur	20
2.6.1.2	Zellaufschluß	20
2.6.1.3	Zwei-Phasen –Verteilung	21
2.6.1.4	Anionenaustauschchromatographie an MonoQ	21
2.6.1.5	Gelpermeationschromatographie	21
2.6.1.6	Lösungen zur Präparation von <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Synthetase	22
2.6.2	Rekombinante Produktion und chromatographische Reinigung der <i>Escherichia coli</i> Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase	22
2.6.2.1	Zellkultur	22
2.6.2.2	Zellaufschluß	23
2.6.2.3	Anionenaustauschchromatographie an MonoQ	23
2.6.2.4	Präparative Gelpermeationschromatographie	23
2.6.2.5	Lösungen zur Präparation von <i>Escherichia coli</i> Glutamat-1- semialdehyd-2,1-Aminomutase	23
2.6.3	Rekombinante Produktion, Renaturierung und chromatographische Reinigung der <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Reduktase	24
2.6.3.1	Zellkultur	24
2.6.3.2	Zellaufschluß und Reinigung der Inclusion Bodies	24
2.6.3.2.1	Lösungen zur Reinigung der Inclusion Bodies	25
2.6.3.3	Renaturierung der Glutamyl-tRNA Reduktase aus Inclusion Bodies an Nickel-IDA-Sepharose	25

2.6.3.3.1	Lösungen zur Renaturierung der <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Reduktase	25
2.6.3.4	Trennung von Glutamyl-tRNA Reduktase Dimeren und unspezifischen Proteinaggregaten durch Gel-permationschromatographie	26
2.6.3.4.1	Lösung für die Gelpermeationschromatographie	26
2.6.4	Konzentrierung von Proteinlösungen	27
2.6.5	Dialyse	27
2.7	Proteincharakterisierung	27
2.7.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
2.7.1.1	Lösungen zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	27
2.7.2	Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration	28
2.7.3	Analytische Gelfiltration	29
2.7.4	N-terminale Proteinsequenzierung	29
2.7.5	MALDI-Massenspektrometrie	29
2.7.6	Zirkularer Dichroismus (CD)	29
2.8	Glutamyl-tRNA Reduktase Aktivitätstests	30
2.8.1	Herstellung des Substrates <i>Escherichia coli</i> [^{14}C]Glu-tRNA ^{Glu}	30
2.8.2	Herstellung des misacylierten Substrates <i>Escherichia coli</i> [^{14}C]Gln-tRNA ^{Glu}	31
2.8.3	Lösungen zur Substratherstellung	31
2.8.4	Reinigung aminoacylierter tRNA	31
2.8.5	Glutamyl-tRNA Reduktase Aktivitätstest	32
2.8.6	Lösungen für den Glutamyl-tRNA Reduktase Aktivitätstest	32
2.8.7	Identifizierung der Glutamyl-tRNA Reduktase Reaktionsprodukte	33
2.8.8	Lösung für die HPLC	33
2.8.9	Chemische Modifikation der Glutamyl-tRNA Reduktase	33
2.8.10	Inhibition der Glutamyl-tRNA Reduktase durch Chelatisierungsreagenzien, Metallionen und potentielle Substratanaloga	34
2.9	Kristallisationsversuche mit der <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Reduktase	34
2.10	Nachweis des kovalenten Thioester-Zwischenproduktes	35
2.11	Co-Immunoprecipitation	35
2.11.1	Entfernung von unspezifischen Antikörpern aus dem Kaninchen Anti-GluTR Serum	36

2.11.2	<i>In vivo</i> Co-Immunopräzipitation	36
2.11.3	<i>In vitro</i> Co-Immunopräzipitation	37
2.11.4	Lösungen zur Co-Immunopräzipitation	37
2.12	Protein Cross-Linking	38
3	Ergebnisse und Diskussion	39
3.1	Herstellung von <i>Escherichia coli</i> tRNA ^{Glu} durch <i>in vivo</i> Transkription und chromatographische Reinigung	39
3.2	Rekombinante Produktion und chromatographische Reinigung der <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Synthetase	42
3.3	Rekombinante Produktion und Reinigung der <i>Escherichia coli</i> Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase	44
3.4	Produktion, Renaturierung und Reinigung der Glutamyl-tRNA Reduktase aus <i>Escherichia coli</i>	47
3.4.1	Trennung von Glutamyl-tRNA Reduktase Dimeren und unspezifischen Proteinaggregaten durch Gelpermeationschromatographie	48
3.5	Charakterisierung der <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Reduktase	50
3.5.1	N-terminale Aminosäuresequenzbestimmung und Massenspektrometrie	50
3.5.2	Native molekulare Masse	51
3.5.3	Aggregationsverhalten der nativen GluTR	53
3.5.4	Zirkularer Dichroismus	55
3.6	Funktionelle Charakterisierung der <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Reduktase	57
3.6.1	Bestimmung des pH-Optimums und der spezifischen Aktivität von <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Reduktase	59
3.6.2	Substrateigenschaften aminoacylierter, unmodifizierter tRNA ^{Glu} -Transkripte	60
3.7	Der Mechanismus der <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Reduktase	62
3.7.1	Spektroskopische Eigenschaften der <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Reduktase	62
3.7.2	Für die Aktivität der <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Reduktase sind Metallionen notwendig	63
3.7.3	Inhibition der <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Reduktase durch Schwermetalle	64

3.7.4	In Abwesenheit von NADPH besitzt die <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Reduktase eine Esterase-Aktivität	64
3.7.5	Chemische Modifikation der <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Reduktase zur Bestimmung katalytisch relevanter Aminosäurereste	66
3.7.6	Nachweis des Thioester-Zwischenproduktes	67
3.7.7	Inhibition der Glutamyl-tRNA Reduktase durch Häm	69
3.7.8	Inhibition der <i>Escherichia coli</i> GluTR durch das Substratanalogon Glutamycin	70
3.8	Mutagenesestudien zum Verständnis des Mechanismus der <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Reduktase	71
3.8.1	Die <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Reduktase-Variante C50S besitzt weder Reduktase- noch Esterase-Aktivität	72
3.9	Untersuchungen zur Substratspezifität der <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Reduktase	73
3.9.1	Aktivität der <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Reduktase-Varianten R52Q und R52K mit dem artifiziellen Substrat [¹⁴ C]Gln-tRNA ^{Glu}	75
3.10	Funktionelle Charakterisierung von genetisch selektierten <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Reduktase-Mutanten	76
3.11	Wechselwirkung der <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Reduktase mit der Glutamyl-tRNA Synthetase und Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase	78
3.11.1	Co-Immunopräzipitationsanalysen mit zellfreien <i>Escherichia coli</i> Extrakten	80
3.11.2	<i>In vitro</i> Co-Immunopräzipitationsstudien	83
3.12	Kristallisation der <i>Escherichia coli</i> Glutamyl-tRNA Reduktase	86
4	Zusammenfassung	87
5	Ausblick	88
6	Literatur	89

Abkürzungen und Glossar

ALA	5-Aminolävulinsäure
ALDH	Aldehyddehydrogenase
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
A_{Xnm}	Absorption bei einer Wellenlänge von X nm
β -ME	2-Mercaptoethanol
BCIP	5-Brom-4-Chlor-3-Indolylphosphat
BICINE	N,N-bis-(2-hydroxyethyl)-Glycin
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
CD	Zirkulärer Dichroismus („circular dichroism“)
CHAPS	3-[(3-Cholamidopropyl)-Dimethylammonio]-Propansulfat
CoA	Coenzym A
d	Tag
Da	Dalton
Depletionstest	Aktivitätstest, bei dem die Abnahme des Substrats verfolgt wird
DMF	N,N-Dimethylformamid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („desoxyribonucleic acid“)
dpm	Zerfälle pro Minute („desintegrations per minute“)
ds	doppelsträngig
DTNB	5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure
DTT	1,4-Dithio-D,L-threitol
ϵ	molarer Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiamin-tetraessigsäure
EF-Tu	Elongations-Tu
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethyl)-N,N,N',N'-tetraessigsäure
ESI-MS	Elektrosprayionisation-Massenspektrometrie
FAD	Flavin-adenin-dinucleotid (oxidiert)
FMN	Flavin-mononucleotid

FPLC	Schnelle Protein-Flüssigkeitschromatographie („fast protein liquid chromatography“)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GluRS	Glutamy-tRNA Synthetase
GluTR	Glutamyl-tRNA Reduktase
Glu-tRNA ^{Glu}	Glutamyl-tRNA
GPC	Gelpermeationschromatographie
GSA	Glutamat-1-semialdehyd
GSA-AM	Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase
HEPES	2-[4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl]-ethansulfonsäure
HPLC	Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie („high performance liquid chromatography“)
IAA	Iodacetamid
IDA	„Iminodiacetic acid“
IgG	Immunglobulin G
Inclusion Bodies	Einschlußkörper
IPTG	Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid
KE	Kegelspitze
LB	Luria-Bertani (Medium)
MALDI-MS	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization Mass Spectrometry
MES	β-Morpholino-Ethansulfonsäure
min	Minute
MOPS	3-(N-Morpholino)-Propansulfonsäure
M _r	relative molekulare Masse
MWCO	Ausschlußgrenze („Molecular Weight Cut Off“)
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinukleotid-phosphat (reduziert)
NBT	Nitro Blau Tetrazolium
OD _{Xnm}	optische Dichte bei einer Wellenlänge von X nm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCA	Perchloressigsäure
PCI	Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PEG	Polyethylenglycol
PIPES	Piperazin-N,N'-bis(2-ethansulfonsäure)

PLP	Pyridoxal-5'-phosphat
PMP	Pyridoxamin-5'-phosphat
RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
rpm	Umdrehung pro Minute („rounds per minute“)
SDS	Natriumdodecylsulfat
s	Sekunde
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetamethylethylendiamin
TPCK	N-Tosyl-L-phenylalanin-chlormethylketon
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
tRNA ^{Glu}	glutamatspezifische Transfer-RNA
U	Einheiten („units“)
UV	Ultraviolett
V ₀	Ausschlußvolumen
V _t	Säulenvolumen
v/v	Volumen pro Volumen („volume per volume“)
w/v	Gewicht pro Volumen („weight per volume“)
WT	Wildtyp

1 Einleitung

1.1 Tetrapyrrole

Tetrapyrrole sind ringförmige Moleküle, die als Grundbaustein einen Stickstoff enthaltenden fünfgliedrigen Heterocyclus aufweisen. Im Tetrapyrrol sind die einzelnen Pyrrole über Methinbrücken miteinander verknüpft. Die verschiedenen Tetrapyrrole unterscheiden sich in folgenden Merkmalen: dem Oxidationszustand des Ringsystems, der Art des zentralen Metallions und den Seitenketten. Im Falle des Vitamin B₁₂ ist zusätzlich die Struktur des Ringsystems verändert. Aufgrund des Ringsystems und der koordinierten Metallionen können Tetrapyrrole redoxaktiv sein. Man unterteilt Tetrapyrrole in acht verschiedene Klassen: Häme, Chlorophylle, Bakteriochlorophylle, Corrinoide, Cofaktor F₄₃₀, Häm *d_l*, Sirohäm und offenkettige Tetrapyrrole (Abb. 1). So finden sich Tetrapyrrole in nahezu allen erforschten Organismen dieser Erde. Die Natur setzt Tetrapyrrole für verschiedenste Zwecke ein, so als Cofaktoren für eine große Anzahl von Enzymen, als redoxaktive Moleküle in Elektronen- und Sauerstofftransportprozessen und als Photorezeptoren in Photosystemen (Jordan, 1991; Jahn *et al.*, 1996; Frankenberg *et al.*, 2003).

1.2 Synthesewege der 5-Aminolävulinsäure

Die Biosynthese des Tetrapyrrolkerns verläuft bei den meisten Organismen gleich. Der Porphyrinring wird aus acht Molekülen des ersten gemeinsamen Zwischenproduktes, der 5-Aminolävulinsäure (ALA), gebildet. Die Synthese der Aminolävulinsäure stellt einen entscheidenden regulatorischen Kontrollpunkt der Tetrapyrrolbiosynthese dar (Schobert & Jahn, 2002; Wang *et al.*, 1999a,b).

In der α -Gruppe der Proteobakterien, in Hefen, bei Vögeln und in Säugetierzellen wird ALA über den Shemin (C₄)-Syntheseweg gebildet. Dabei katalysiert die 5-Aminolävulinsäure-Synthase die Kondensation von Succinyl-Coenzym A und Glycin (Shemin & Russell, 1953). Unter Verwendung des Cofaktors Pyridoxal-5'-phosphat werden ALA, CoA und CO₂ gebildet.

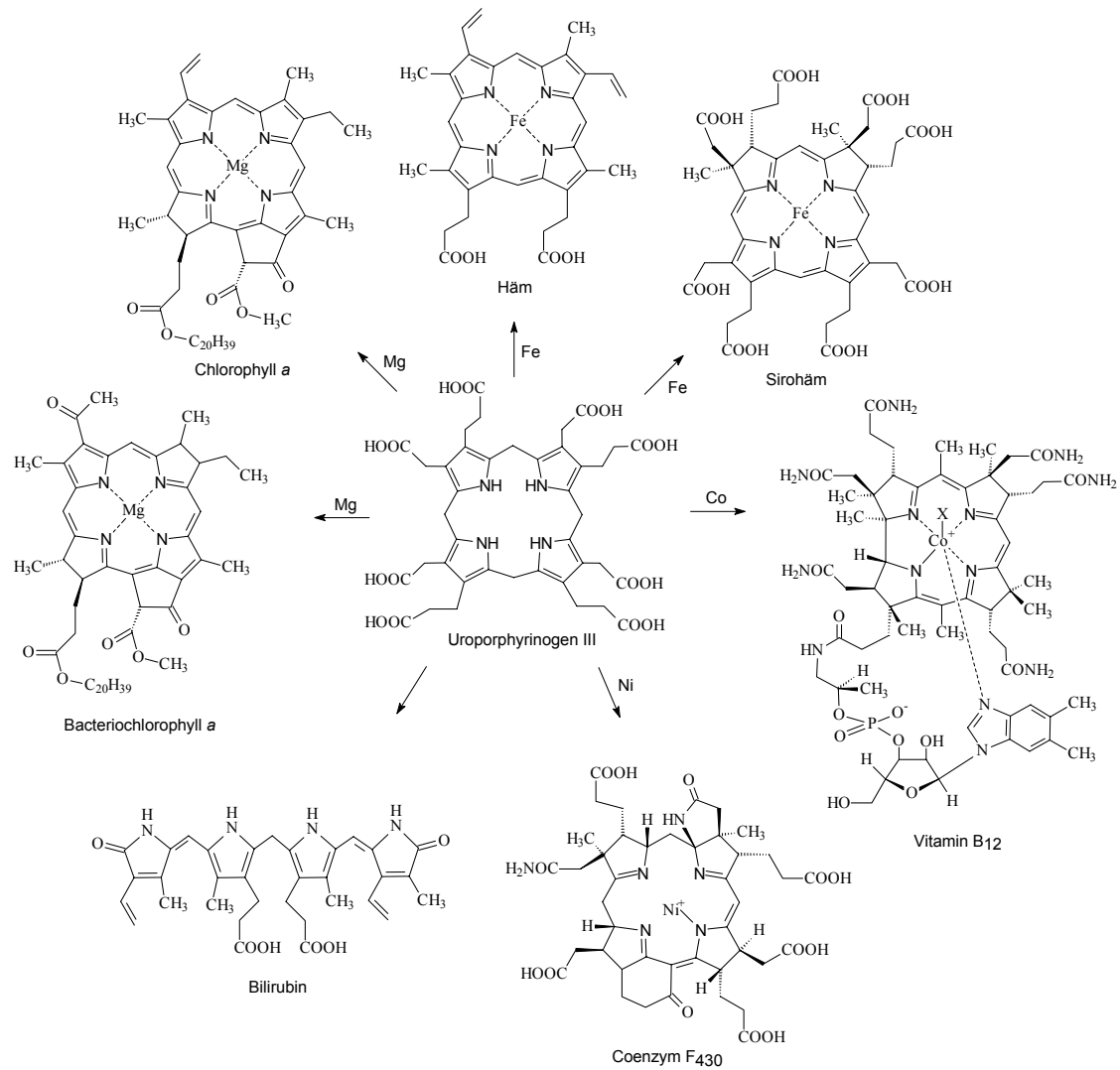


Abbildung 1: Strukturen von wichtigen Vertretern der acht Tetrapyrrolklassen mit ihrem gemeinsamen Vorläufermolekül Uroporphyrinogen III

Ein alternativer ALA-Syntheseweg (C_5 -Syntheseweg) wurde Anfang der 70er Jahre bei Untersuchungen über die Umsetzung von radioaktiv markiertem Glutamat in Pflanzengewebe entdeckt (Beale & Castelfranco, 1973; Beale *et al.*, 1975). Folgend wurde dieser Weg auch für Chloroplasten von Grünalgen, Cyanobakterien, einen Großteil der Bakterien, (zum Beispiel *Escherichia coli* und *Bacillus subtilis*) und Archaea beschrieben. ALA wird in diesen Organismen aus dem C_5 -Kohlenstoffgerüst des Glutamats gebildet (Chen *et al.*, 1990; Jahn *et al.*, 1992). Besonders interessant an diesem Biosyntheseweg ist die Beteiligung einer Transfer RNA ($tRNA^{Glu}$) an der Umsetzung von Glutamat zu ALA (Kannangara *et al.*, 1984; Schön *et al.*, 1986). Die Vorstufe des C_5 -Syntheseweges ist die mit L-Glutamat aminoacylierte

tRNA^{Glu} (Glu-tRNA^{Glu}), welche in einer NADPH-abhängigen Reaktion von der Glutamyl-tRNA Reduktase (GluTR, kodiert durch *hemA*) zu Glutamat-1-semialdehyd (GSA) umgesetzt wird, wobei tRNA^{Glu} frei wird (Jahn *et al.*, 1991). Der Semialdehyd wird anschließend durch eine spezifische Transaminase, der GSA-2,1-Aminomutase (GSA-AM), zu ALA umgesetzt (Ilag & Jahn, 1992; Jahn *et al.*, 1991)(Abb. 2).

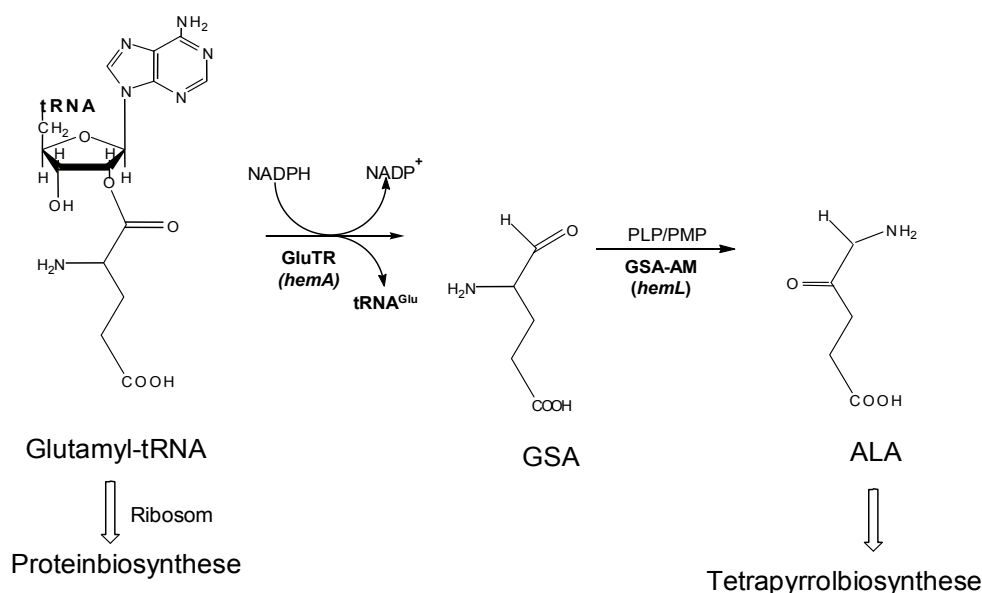


Abbildung 2: Der C₅-Syntheseweg zur Bildung von 5-Aminolävulinsäure. GluTR reduziert Glu-tRNA^{Glu} zu GSA unter Freisetzung von tRNA^{Glu}. GSA wird durch die GSA-AM zu ALA umgewandelt. Sowohl die Proteinbiosynthese als auch die Tetrapyrrolbiosynthese nutzen die identische Glu-tRNA^{Glu} als Substrat.

1.3 Die Biosynthese von Tetrapyrrolen

Der Syntheseweg von ALA bis zum ersten, makrozyklischen Tetrapyrrol, dem Uroporphyrinogen III, verläuft bei allen bisher untersuchten Organismen über identische Zwischenprodukte. Im ersten Schritt erfolgt hierbei die Kondensation zweier Moleküle ALA zum Grundbaustein aller Tetrapyrrole, dem Pyrrolderivat Porphobilinogen (Frankenberg *et al.*, 1999a,b,c). Vier Moleküle Porphobilinogen werden anschließend zu dem linearen Tetrapyrrol Prä-Uroporphyrinogen zusammengefügt und schließlich zu Uroporphyrinogen III zyklisiert, welches als universelles Vorläufermolekül für die Synthese aller Tetrapyrrol-derivate dient (Jordan, 1991; Jahn *et al.*, 1996). Auf der Stufe des Uroporphyrinogens III

kommt es dann zu einer Verzweigung der Synthesewege. Uroporphyrinogen III kann über Coproporphyrinogen III, Protoporphyrinogen IX und Protoporphyrin IX in die Vertreter der Klasse der Porphyrine wie Häm, Chlorophylle, Bakteriochlorophylle und offenkettige Biline umgewandelt werden. Über einen alternativen Weg wird Uroporphyrinogen III methyliert und anschließend über Dihydrosirohydrochlorin in die Porphonoide Sirohäm, Corrinoide, Coenzym F₄₃₀ und Häm *d*₁ umgewandelt (Jordan, 1991)(Abb. 3). Erste Untersuchungen an dem Sulfat reduzierenden, obligat anaeroben Bakterium *Desulfovibrio vulgaris*, deuten auf einen ursprünglichen Weg zur Porphyrinsynthese hin. Dieser phylogenetisch mit den ersten auf der Erde lebenden Organismen verwandte Organismus besitzt einen bisher unbekannten Biosyntheseweg vom Uroporphyrinogen III zum Coproporphyrinogen III. Hierbei erfolgt zunächst die S-Adenosyl-Methionin abhängige Methylierung des Uroporphyrinogen III zum Dihydrosirohydrochlorin welches nach der Decarboxylierung zum 12,18-Didecarboxy-Dihydrosirohydrochlorin und anschließender Deacetylierung zum Coproporphyrinogen III umgesetzt wird (Ishida *et al.*, 1998).

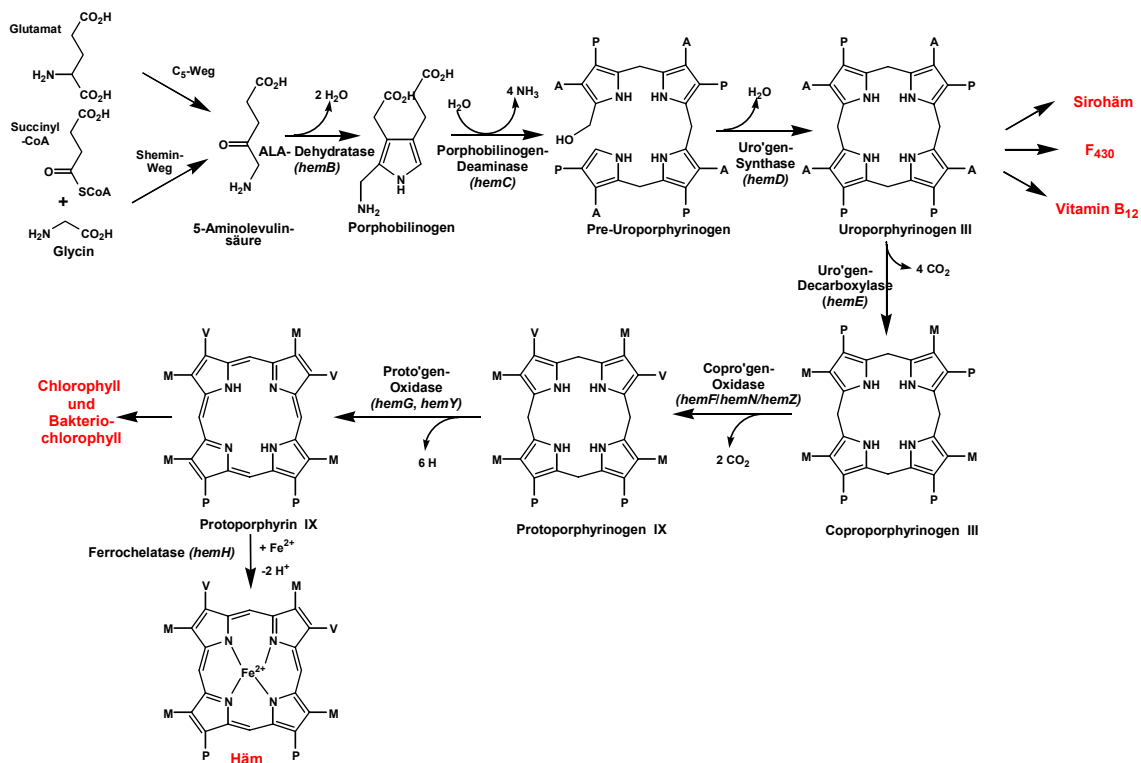
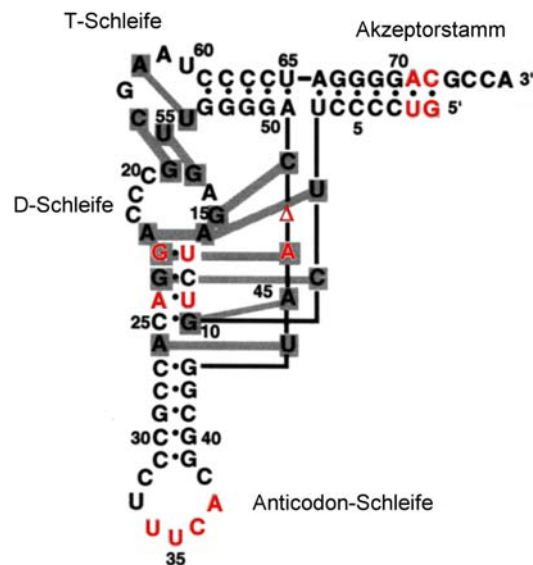


Abbildung 3: Übersicht über die Häm-Biosynthese. Benannt sind die für die einzelnen Schritte relevanten Enzyme. In Klammern sind bekannte, zugehörige Gene bakteriellen Ursprungs genannt. A = Acetatrest; P = Propionatrest; M = Methylrest; V = Vinylrest.

1.4 Die glutamatspezifische Transfer-RNA

Die Glu-tRNA^{Glu} dient als aktivierte Vorstufe der Proteinbiosynthese und der Tetra-pyrrolsynthese. Es wurde 1992 erstmalig für *Synechocystis* und *Chlamydomonas reinhardtii* gezeigt, dass dieselbe tRNA beide Funktionen ausübt (Jahn *et al.*, 1992).

Die Identitätselemente der tRNA^{Glu} aus *E. coli* für die *E. coli* Glutamyl-tRNA Synthetase (GluRS) wurden mit Hilfe von Mutanten der *in vitro* synthetisierten tRNA^{Glu} beschrieben. (Sekine *et al.*, 1996). Basierend auf diesen Arbeiten gelang es die tRNA^{Asp} durch Mutation der Identitätsbasen in eine Glutamat-spezifische tRNA umzuwandeln (Sekine *et al.*, 1999). Die GluRS erkennt dabei die Basen des Anticodons, des Akzeptorstammes und Basen in der D-Schleife. Die GluRS ist eine der wenigen Aminoacyl-tRNA Synthetasen, die eine posttranskriptionelle Modifikation einer tRNA erkennt. tRNA^{Glu} hat als positive Determinante eine Modifikation der Anticodonbase U34 in 5-Methylamino-Methyl-2-Thiouridin (mm⁵s²U). Eine *in vitro* synthetisierte, unmodifizierte tRNA^{Glu} hat einen um den Faktor 520 verringerten k_{cat}/K_M -Wert als Substrat für die GluRS im Vergleich zur voll modifizierten Variante (Sylvers *et al.*, 1993; Madore *et al.*, 1999)(Abb. 4).



tRNAs ein hochkonserviertes G:C Basenpaar ist, das als mögliches Identitätsmerkmal interpretiert wurde (Peterson *et al.*, 1988). In einem weiteren Ansatz wurde die Fähigkeit zur Reduktion partiell gereinigter tRNA^{Glu} aus verschiedenen Quellen durch angereicherte GluTR Fraktionen aus Gerste bestimmt. Nach Sequenzvergleichen wurden die Basen A7:U66, U29:A41, A53:U61 und U72 als Erkennungsmerkmale gedeutet (Willows *et al.*, 1995). Ein weiteres Ergebnis brachte die Untersuchung von *Euglena gracilis* Mutanten, die ihre Fähigkeit zur Chlorophyllproduktion verloren hatten. Es wurde eine tRNA^{Glu} mit einer Basentransition von Cytosin nach Uridin an Position 56 gefunden. Die mutierte tRNA wurde zwar von der GluRS aminoacyliert, war jedoch ein schlechtes Substrat für die GluTR (Stange-Thomann *et al.*, 1994). Es konnte von Lennart Randau im Rahmen seiner Diplomarbeit in unserem Labor gezeigt werden, dass eine *E. coli* tRNA^{Glu} mit der Mutation C56U ein sehr schlechtes Substrat für die *E. coli* GluTR ist. Durch eine weitere Mutation der Base G19, welche dann wieder eine ternäre Watson-Crick Bindung mit C56 erlaubt, konnte für die tRNA-Doppelmutante C56U, G19A nahezu volle Akzeptanz durch die GluTR wiederhergestellt werden. Diese Ergebnisse sprechen für eine Erkennung der speziellen Struktur des ternären Kerns der tRNA^{Glu}. Weitere Hinweise für eine Erkennung der gesamten tRNA-Form anstatt einzelner Basen durch die GluTR lieferten kinetische Analysen von aminoacylierten tRNA^{Glu}-Mutanten, in denen die Basen U8, G22, A46 ausgetauscht wurden und die eine Deletion der Base 47 trugen. Neben diesen Haupteckennungsmerkmalen konnten keine weiteren für die Erkennung essentiellen Basen z.B. im Bereich des Akzeptorarms und des Anticodonloops identifiziert werden.

1.5 Die Glutamyl-tRNA Synthetase

Die Aktivierung von Aminosäuren und ihre anschließende Verknüpfung mit einer tRNA wird von spezifischen Aminoacyl-tRNA Synthetasen katalysiert. Hierbei erfolgt die Bildung eines Aminoacyladenylats aus einer Aminosäure und ATP. Von dieser aktivierten Verbindung wird im folgenden Schritt die Aminoacylgruppe auf ein tRNA-Molekül übertragen, wobei eine Aminoacyl-tRNA entsteht. Dieser aktivierte Aminosäureester ermöglicht die thermodynamisch ungünstige Bildung einer Peptidbindung zwischen der Amino- und der Carboxylgruppe zweier Aminosäuren. Während die Rolle der Aminoacyl-Synthetasen bei der Proteinbiosynthese schon seit 1957 bekannt ist, wurde erst 1986 entdeckt, dass die GluRS mit Glu-tRNA^{Glu} sowohl eine Vorstufe der Proteinbiosynthese, als auch der Tetrapyrrolsynthese

bereitstellt (Huang & Wang, 1986; Schön *et al.*, 1986). Prokaryotische GluRS besitzen relative molekulare Massen (M_r) von 54-56,000 und liegen als Monomere vor (Lapointe & Söll, 1972; Breton *et al.*, 1990). 1995 wurde die Kristallstruktur der *Thermus thermophilus* GluRS (Nureki *et al.*, 1995) und 2001 die Struktur des GluRS:tRNA^{Glu} Komplexes gelöst (Sekine *et al.*, 2001).

In vielen Bakterien, Archaea, Chloroplasten und Mitochondrien fehlt eine Glutaminspezifische Aminoacyl-tRNA Synthetase. In diesen Systemen aminoacyliert die Glutaminspezifische tRNA Synthetase sowohl tRNA^{Glu} als auch Glutaminspezifische tRNA. Das "misacylierte" Produkt, Glu-tRNA^{Gln}, wird anschließend durch eine Transamidase zu Glu-tRNA^{Glu} konvertiert.

1.6 Die Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase

Die GSA-AM katalysiert den letzten Schritt des C₅-Syntheseweges, den Transfer der Aminogruppe von C2 auf C1 unter Bildung von ALA (Hoover *et al.*, 1988). Aminomutasen besitzen relative molekulare Massen von 80-92,000 und bestehen aus zwei identischen Untereinheiten, von denen jede einen Pyridoxal-5'-phosphat Cofaktor enthält (Avisar & Beale, 1989). Der exakte Enzymmechanismus wurde spektroskopisch an rekombinanter GSA-AM aus *Synechococcus* und *E. coli* aufgeklärt (Smith *et al.*, 1991; Ilag & Jahn, 1992; Contestabile, 2000). Seit 1997 ist die Kristallstruktur der GSA-AM aus *Synechococcus* bekannt (Hennig *et al.*, 1997).

1.7 Die Glutamyl-tRNA Reduktase

Auf die Entdeckung des C₅-Syntheseweges in *E. coli* (O'Neill *et al.*, 1989; Li *et al.*, 1989a) und die Sequenzierung und Klonierung des *E. coli hemA*-Gens (Verkamp & Chelm 1989; Li *et al.*, 1989b;) folgte der Funktionsnachweis des *E. coli hemA*-Genproduktes erstmals in Hefe (Verkamp *et al.*, 1992). Hierdurch war bewiesen, dass das *E. coli hemA*-Gen die GluTR kodiert.

Bis zum Beginn der vorliegenden Arbeit war es nicht gelungen das Enzym aus *E. coli* in ausreichender Menge für eine biophysikalische Charakterisierung herzustellen. Dies war auf

den Umstand der geringen zellulären GluTR-Konzentrationen *in vivo* und die Bildung von unlöslichen Einschlusskörpern (Inclusion Bodies) bei der rekombinanten Überproduktion mit verschiedenen Expressionssystemen zurückzuführen (Jahn *et al.*, 1991; Verkamp *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1996). Die gewonnenen Ergebnisse für gereinigte GluTR aus Gerste, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Bacillus subtilis* und *Synechocystis sp.* PCC 6803 unterscheiden sich erheblich bezüglich der gefundenen Molekulargewichte, Cofaktoren und Aktivitäten (Vothknecht *et al.*, 1996; Vothknecht *et al.*, 1998; Pontoppidan & Kannangara, 1994; Chen *et al.*, 1990; Jahn, 1992). Eine erste biochemische Charakterisierung mit Hilfe eines neu etablierten Aktivitätstest der GluTR aus *Methanopyrus kandleri* führte zu einem Modell des enzymatischen Mechanismus des Enzyms (Moser *et al.*, 1999). Danach greift ein nukleophiler Cysteinrest der GluTR die durch eine Esterbindung an tRNA^{Glu} aktivierte α -Carboxylgruppe des Glutamats an. Danach wird ein am Enzym lokalisierter Acyl-Thioester gebildet und tRNA^{Glu} freigesetzt. Durch direkte Hydridübertragung von dem Cofaktor NADPH wird dieses kovalente Zwischenprodukt zu GSA reduziert. In Abwesenheit von NADPH wird der hochreaktive Thioester hydrolytisch gespalten und es entsteht Glutamat (Abb. 5).

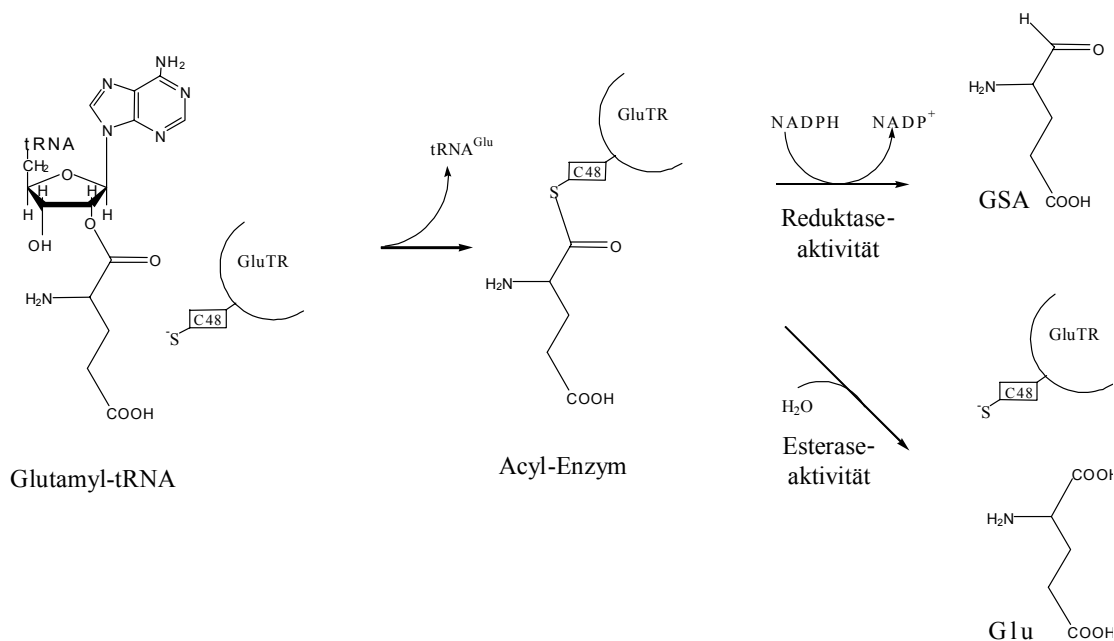


Abbildung 5: Postulierter Enzymmechanismus der GluTR. Die reaktive Sulfhydrylgruppe des Cysteinrestes 48 greift nucleophil die α -Carboxylgruppe der Glutamyl-tRNA^{Glu} an. Dabei wird die tRNA^{Glu} freigesetzt und ein kovalentes Thioester-Zwischenprodukt gebildet. In Gegenwart von NADPH wird durch direkte Hydridübertragung das Reaktionsprodukt GSA gebildet. In Abwesenheit von NADPH wird das Zwischenprodukt durch eine Esterase-Aktivität hydrolysiert

Als nächstes wurde die Kristallstruktur der GluTR aus *M. kandleri* gelöst (Moser *et al.*, 2001) (Abb. 6). Hiernach liegt die GluTR als ungewöhnliches, ausladendes V-förmiges Dimer vor. Jedes Monomer setzt sich aus drei Domänen zusammen, die entlang einer gekrümmten “spinalen” α -Helix angeordnet sind.

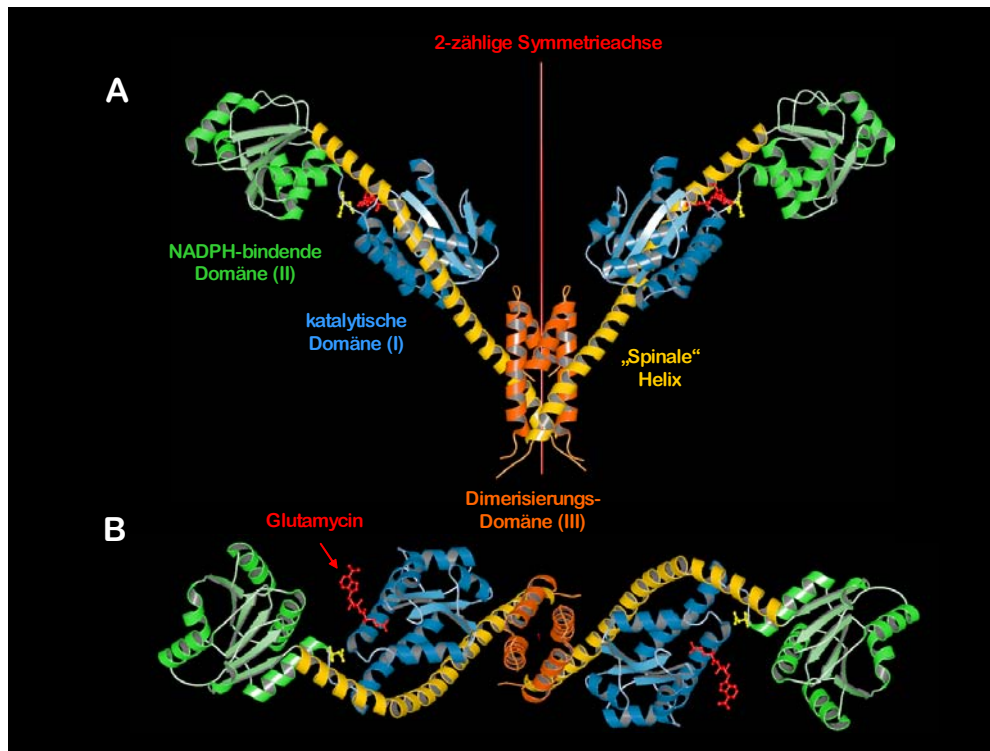


Abbildung 6: Struktur der *M. kandleri* GluTR, senkrecht (A) und entlang (B) der zweizähligen Achse betrachtet. Die Monomere bestehen aus drei Domänen: der katalytischen Domäne (blau), der NADPH-bindenden Domäne (grün) und der Dimerisierungsdomäne (rot), die entlang einer langen “spinalen” α -Helix angeordnet sind. Glutaminsäure (rot) bindet an der katalytischen Domäne.

Die Domänen sind gemäß ihrer Funktion als katalytische, NADPH-bindende und Dimerisierungsdomäne bezeichnet. Ordnet man die GluTR neben der ähnlichen dimeren Struktur der GSA-AM aus *Synechococcus* sp. (Hennig *et al.*, 1997) an, so fällt auf, dass das von der GSA-AM eingenommene Volumen genau in die von den GluTR-Monomeren ausgebildete Lücke passt. Die Verbindung und Annäherung der beiden Enzyme entlang ihrer zweifachen Symmetrieachsen führt zu einem Modellkomplex mit bemerkenswerter Oberflächenkomplementarität (Abb. 33 B). In gleicher Weise lässt sich die *E. coli* tRNA^{Glu} zu diesem *in silico* Modell hinzufügen, ohne dass es zu sterischen Konflikten kommt (Abb. 33 C/D).

Die tRNA-abhängige Bildung von ALA in Pflanzen und den meisten Bakterien benötigt die aufeinander abgestimmte Aktion von GluTR und GSA-AM, die beide metabolisch durch den chemisch hochreaktiven Aldehyd GSA verknüpft sind (Abb. 2). Der vorgeschlagene ternäre Komplex 2GluTR/2tRNA^{Glu}/2GSA-AM böte eine attraktive Lösung für dieses metabolische Problem, da durch den direkten Transfer des GSA von der GluTR zur GSA-AM dieser nicht der wäßrigen Umgebung des Cytosols ausgesetzt wäre. Bislang gab es aber keine experimentellen Belege für die direkte Interaktion zwischen der GluTR und der GSA-AM.

1.8 Zielsetzung der Arbeit

In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst ein reproduzierbares Produktionsverfahren zur rekombinanten Darstellung von *E. coli* GluTR im mg-Maßstab geschaffen werden. Das gereinigte Enzym sollte mit dem neu etablierten Enzymtest biochemisch charakterisiert und der postulierte Enzymmechanismus durch den Nachweis des zentralen Thioester- Zwischenproduktes bestätigt werden.

Die Wechselwirkung des Proteins mit seinem tRNA Substrat sollte auf den Beitrag posttranskriptionaler Modifikationen der RNA untersucht und die Substratspezifität des Enzyms durch ortsgerichtete Mutagenese gezielt verändert werden. Zum Verständnis der GluTR-Funktion *in vivo* sollten potentielle Wechselwirkungspartner identifiziert und die Struktur des Enzyms nach erfolgter Kristallisation durch Röntgen-Strukturanalyse bestimmt werden.

2 Material und Methoden

2.1 Chemikalien und Geräte

2.1.1 Geräte und Kits

Agarosegelelektrophorese	Agagel	Biometra
Autoklav	LVSY 50/70	Zirbus
Kristallisation	Crystall Screen™, MembFac, Crystall Screen II™, Crystall Screen Lite und Cryo Screen	Hampton Research
Elektroporation	Gene Pulser II	BioRad
FPLC	ÄKTApurifier	Amersham Bioscience
French Press	French Pressure Cell	SLM Aminco
Thermocycler	Tpersonal	Biometra
HPLC	HPLC System	Jasco
Ultraschallgerät	HD 2070	Bandelin
Szintillationszähler	TriCarb 2900TR	Packard Bioscience
pH-Meßgerät	pH-Meter C 6840 B	Schott
Photometer	Ultrospec 2000	Amersham Bioscience
Durchfluß Radioaktivitäts- Monitor	Ramona 2000	Raytest
Reinstwasseranlage	Milli-Q System	Millipore
SDS-PAGE	Mini Protean II	BioRad
Elektroblotting	Trans-Blot SD	BioRad
PVDF-Membran	Roti-PVDF	Roth
Sterile Werkbank	HeraSafe	Heraeus
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf
Pipetten	Research	Eppendorf
Videodokumentationsanlage	GelDoc	BioRad
Waagen	SBA 52	Scaltec
	HC 52	Mettler
Zentrifugen	Centrifuge 5415 C	Eppendorf
	Centrifuge 5403	Eppendorf

Material und Methoden

	Biofuge pico	Heraeus
	RC-5B Plus	Sorvall
	Speedvac Concentrator	Savant
	L7-65 Ultracentrifuge	Beckman
Sterilfilter	Filtropur S 0.2	Millipore
Proteinbestimmung	BCA-Test	Pierce
Mutagenese Kit	QuickChange™	Stratagene
Ultrafiltrationsmembran	Centricon-10	Amicon
	Ultrafree-15	Amicon
<i>In vitro</i> Protein Synthese	RTS 500	Roche
Phosphor-Image Platte	Imaging Screen K	Kodak
Phosphoimager	Molecular Imager® FX	BioRad
CD-Spektrometer	J-810	Jasco

2.1.2 Chemikalien

Molekularbiologische Enzyme	New England Biolabs
Kulturmedien	Difco
Kaninchen Anti-Ec GluTR Antikörper	Eurogentec
Kaninchen Anti-Ec GSA-AM Antikörper	Eurogentec
Kaninchen Anti-Mk GluTR Antikörper	Eurogentec
Kaninchen Anti-Mk GluTR Antikörper	Eurogentec
Ziegen Anti-Kaninchen IgG Antikörper konjugiert mit Alkalischer Phosphatase	Pierce
<i>E. coli</i> tRNA ^{Glu}	Sigma/eigene Produktion
[¹⁴ C]-Glutamat	NEN-Life Sciences
[¹⁴ C]-Glutamin	NEN-Life Sciences
[¹⁴ C]-ALA	NEN-Life Sciences
Hi Trap Chelating Sepharose Fast Flow™	Amersham Pharmacia
DNA-Isolierung	Quiagen
Proteaseinhibitor, Complete™ EDTA-free	Roche
Protein A Sepharose™ CL-4B	Amersham Pharmacia

Weitere Chemikalien und Reagenzien, die in der vorliegenden Arbeit verwendet wurden und hier nicht angegeben sind, wurden von folgenden Firmen bezogen: Amersham Pharmacia, Fluka, Gerbu, Merck, New England Biolabs, Promega, Riedel-de-Haën, Roche, Roth und Sigma.

2.2 Bakterienstämme und Plasmide

2.2.1 Bakterienstämme

Alle in dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1:

<i>Escherichia coli</i> Stamm	Genotyp	Quelle
DH5α	F ⁺ <i>supE44D(argF-lac) U169 j80dlacZΔM15 hsdR17 recA1 endA1 gyrA96 thi-1 relA1</i>	Sambrook <i>et al.</i> , 1989
DH10β	F ⁺ <i>mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) j80dlacZΔM15 ΔlacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ(ara, leu) 7697 galU galK λ⁻ L nupG</i>	Gibco Life Technologies
BL21(λDE3)	F ⁺ <i>ompZ r^m λ_{lys} PlacUV5-T7-GenIPlac^q-lacI</i>	Studier <i>et al.</i> , 1990
EV61	<i>ΔhemA::kan</i> , Kan ^r	Verkamp <i>et al.</i> , 1989

2.2.2 Plasmide

Alle in dieser Arbeit verwendeten Plasmide sind in der folgenden Tabelle 2 aufgeführt.

Tabelle 2:

Plasmid	Beschreibung	Quelle
pLQ7612	pOU61 Derivat mit <i>E. coli</i> <i>gltX</i> -Gen in den <i>Sau3A</i> - und <i>EcoR1</i> -Schnittstellen des Vektors	Brisson <i>et al.</i> , 1989
pLIpopC	pET3 Derivat mit <i>E. coli</i> <i>hemL</i> -Gen in den <i>PstI</i> - und <i>DdeI</i> - Schnittstellen des Vektors	Ilag <i>et al.</i> , 1991
pKR15	pGFIB Derivat mit <i>E. coli</i> tRNA ^{Glu} -Gen	D. Söll, Yale University, USA
pET15b	Expressionsvektor, IPTG induzierbarer <i>lacUV5</i> -Promotor, N-term. His(6)-Tag, Amp ^r	Novagen
pBKCwt	pET15b Derivat mit <i>E. coli</i> <i>hemA</i> -Gen in den <i>BlpI</i> - und <i>BamHI</i> - Schnittstellen des Vektors	D. Söll, Yale University, USA
pBKC C50S	pBKCwt Derivat, das ein Hema-Protein mit dem Aminosäureaustausch Cys 50 gegen Ser kodiert	diese Arbeit
pBKC C74S	Aminosäureaustausch Cys 74 gegen Ser	diese Arbeit
pBKC C170S	Aminosäureaustausch Cys 170 gegen Ser	diese Arbeit
pBKC C50/74/170S	Aminosäureaustausch Cys 50, 74 und 170 gegen Ser	diese Arbeit

Material und Methoden

pBKC R52Q	Aminosäureaustausch Arg 52 gegen Gln	diese Arbeit
pBKC R52K	Aminosäureaustausch Arg 52 gegen Lys	diese Arbeit
pBKC A338Stop	Aminosäureaustausch Ala 338 gegen ein Stopcodon	diese Arbeit
pBKC 104	Aminosäureaustausch Gly 191 gegen Asp	D. Söll, Yale University
pBKC 107	Aminosäureaustausch Gly 7 gegen Asp	D. Söll, Yale University
pBKC 108	Aminosäureaustausch Arg 314 gegen Cys	D. Söll, Yale University
pBKC 110	Aminosäureaustausch Gly 44 gegen Cys, Ser 105 gegen Asn und Ala gegen Thr	D. Söll, Yale University
pBKC 111	Aminosäureaustausch Gly 106 gegen Asn	D. Söll, Yale University
pBKC 112	Aminosäureaustausch Ser 145 gegen Phe	D. Söll, Yale University
pBKC 113	Aminosäureaustausch Ser 22 gegen Leu und Ser 164 gegen Phe	D. Söll, Yale University
pBKC 236	Aminosäureaustausch Glu 114 gegen Lys	D. Söll, Yale University

2.3 Medien und Medienzusätze

2.3.1 Medien

Für die Kultivierung von *E. coli* wurde ausschließlich das Vollmedium Luria Bertani (LB) verwendet, wie bei Sambrook *et al.*, 1989 beschrieben.

LB-Medium	Hefe-Extrakt	5.0 g/l
	NaCl	10.0 g/l
	Protease-Pepton	10.0 g/l

2.3.2 Medienzusätze

Zusätze wurden als konzentrierte Stammlösungen in Wasser oder Ethanol angesetzt, sterilfiltriert und jeweils unter sterilen Bedingungen dem autoklavierten Medium zugesetzt. Die verwendeten Endkonzentrationen waren:

Ampicillin	100 µg/ml
Kanamycin	25 µg/ml
Chloramphenicol	50 µg/ml
IPTG	250 µM

Agar-Platten wurde vor dem Autoklavieren Agar-Agar zu dem LB-Medium gegeben.

Agar-Agar	15 g/l
-----------	--------

2.4 Mikrobiologische Techniken

2.4.1 Sterilisation

Alle Medien und Puffer wurden bei 121 °C für 20 min dampfsterilisiert. Temperaturempfindliche Substanzen und Lösungen wurden sterilfiltriert (Porengröße des Filters war 0.2 µm).

2.4.2 Bakterienkultivierung

Falls nicht anders angegeben, wurden *E. coli* DH5α, DH10β, EV61 und BL21(λDE3) als Vorkulturen über Nacht bei 37 °C und 200 rpm in Reagenzgläsern kultiviert. Die Bakterienkulturen wurden bei 37 °C und 200 rpm im Schikane-Kolben kultiviert. Inkubationszeiten bis zur Induktion mittels IPTG wurden abhängig von der Zelldichte variiert.

2.4.3 Bestimmung von Zelldichten

Die Zelldichte von Bakterienkulturen wurde durch Messung der OD bei 578 nm im Photometer bestimmt, bei Zelldichten mit einer $OD_{578} \geq 1$ wurde eine 1:10-Verdünnung vermessen. Eine OD_{578} von 1 entspricht hierbei ca. einer Zellzahl von $1 \cdot 10^9$ Zellen pro ml.

2.5 Molekularbiologische Methoden

2.5.1 Herstellung elektrokompenter Zellen

E. coli-Zellen (DH5α, DH10β und BL21(λDE3)) wurden in 500 ml LB-Medium bis zu einer OD_{578} von 0.6 gezüchtet und dann durch Zentrifugation bei 8000 rpm (SLA-3000-Rotor, Sorvall) für 10 min geerntet. Der Überstand wurde verworfen. Das Sediment wurde in 40 ml sterilem deion. H₂O resuspendiert, in ein 50 ml Plastik-Röhrchen überführt und nochmals für 5 min bei 5000 rpm (SLA-3000- Rotor, Sorvall) und 4 °C zentrifugiert. Die letzten drei Schritte wurden noch einmal wiederholt. Das Sediment wurde in steriler 10 %-iger (v/v) Glycerinlösung in Wasser resuspendiert und für 5 min bei 5000 rpm (SLA-3000-Rotor,

Sorvall) und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen. Das Bakterien-sediment wurde in einem Volumenteil, bezogen auf das Sedimentvolumen, 10 %-iger (v/v) Glycerinlösung resuspendiert, in 1.5 ml Reaktionsgefäßen zu je 40 µl portioniert und bei –80 °C eingefroren.

2.5.2 Transformation von Bakterien

E. coli Zellen wurden durch Elektroporation transformiert. Die Durchführung erfolgte nach der Standardmethode wie bei Dower *et al.*, 1988 beschrieben.

2.5.3 Plasmid-DNA-Präparation

Plasmid-DNA wurde je nach Bedarf aus 3 ml oder 150 ml Kulturansätzen mit einem Kit der Firma Quiagen isoliert. Bei der Präparation aus 3 ml-Kulturen (Minipräparation) wurde auf den säulenchromatographischen Teil der Präparation verzichtet. Stattdessen wurde die Plasmid-DNA mit 3 Volumenteilen einer 300 mM NaOAc/Ethanol-Lösung (pH 5.2) gefällt und hiernach laut Herstellerangaben gereinigt.

2.5.4 Bestimmung der Nucleinsäure-Konzentration

Die Konzentration von DNA- bzw. RNA-Lösungen wurde durch die Messung der optischen Dichte bei 260 nm und zur Kontrolle auf Proteinverunreinigung bei 280 nm in einem Photometer bestimmt. Dabei wurde davon ausgegangen, dass einer A_{260} von 1.0 eine dsDNA-Konzentration von 50 µg/ml bzw. ein RNA-Konzentration von 40 µg/ml entspricht (Sambroock, *et al.*, 1989). Die Reinheit ergab sich aus dem Quotient zwischen $A_{260\text{nm}}$ und $A_{280\text{nm}}$. Ein Quotient von 1.8 entspricht dabei einer reinen dsDNA-Lösung, ein Quotient von 2.0 entspricht einer reinen RNA-Lösung.

2.5.5 Schneiden von DNA mit Restriktionsendonukleasen

Das Schneiden von DNA erfolgte mittels Restriktionsendonukleasen in den entsprechenden Restriktionspuffern nach Angaben des Herstellers. Die Inkubationszeit bei 37 °C betrug 3 h.

2.5.6 Agarose-Gelelektrophorese

DNA-Fragmente oder tRNA wurden elektrophoretisch unter nativen bzw. denaturierenden Bedingungen mit Hilfe von Agarose-Gelen aufgetrennt. Als Längenvergleich diente der Standard Generuler DNA Laddermix der Firma NEB. Die Nucleinsäuren wurden nach 10 min Inkubation des Gels in Ethidiumbromid-Lösung durch Fluoreszenz bei einer Wellenlänge von 312 nm detektiert.

2.5.6.1 Lösungen zur Agarose Gelelektrophorese

TAE-Puffer	Tris-Acetat (pH 8.0)	40.0 mM
	EDTA	1.0 mM
Agarosegel	Agarose in TAE-Puffer	1.0 % (w/v)
Probenpuffer	Bromphenolblau	350.0 μ M
	Xylen Cyanol FF	450.0 μ M
	Orange G	0.25 % (w/v)
	Saccharose in Wasser	115.0 mM
Ethidiumbromidlösung	in Wasser	0.1 % (w/v)

2.5.7 Sequenzierung von DNA

Die DNA-Sequenzen der verwendeten Plasmide wurden mittels DNA-Sequenzierungen überprüft. Die automatisierte Sequenzierung wurde von der Firma MWG-Biotech AG durchgeführt.

2.5.8 Ortsgerichtete Mutagenese des *Escherichia coli hemA*-Gens

Zur Einführung von Punktmutationen in den Vektor pBKCwt wurde das QuickChange™ Site Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) verwendet. Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers. Hierbei wurde die jeweilige Mutation durch entsprechende Oligonukleotide (Primer) mittels PCR eingeführt und anschließend die methylierte parentale Plasmid-DNA durch einen *DpnI*-Verdau abgebaut. Die für die ortsgerichtete Mutagenese benötigten Primer wurden bei der MWG-Biotech AG bezogen und sind in Tabelle 3 aufgeführt.

Tabelle 3:

Bezeichnung	Sequenz ^a
EchemAC50Sfor	5'-GTGCTGTCGACGT <u>CTA</u> ACCGCACGGAAC-3'
EchemAC50Srev	5'-GTTCCGTGCGGTT <u>AGAC</u> GTCGACAGCAC-3'
EchemAC74Sfor	5'-GTTAATCCGCTGGCTTT <u>CT</u> GATTATCACAATC-3'
EchemAC74Srev	5'-GATTGTGATAATC <u>AGAA</u> AGCCAGCGGATTAAC-3'
EchemAC170Sfor	5'-GCTTTTGCGGCTT <u>CT</u> ACGCTGGCGCG-3'
EchemAC170Srev	5'-CGCGCCAGCGT <u>AGA</u> AGCCGCAAAAGC-3'
EchemAR52Qfor	5'-CTGTCGACGTGCAACCAGACGGAAC TTTATCTTAGCG-3'
EchemAR52Qrev	5'-CGCTAAGATAAAGTTCCGTCTGGTTGCACGTCGACAG-3'
EchemAR52Kfor	5'-GCTGGCGACGTGCAACAAA <u>AC</u> GGAAC TTTATCTTAGC-3'
EchemAR52Krev	5'-GCTAAGATAAAGTTCCGT <u>TTT</u> GTTGCACGTCGACAGC-3'
EchemAE114Sfor	5'-GATGCACTGGTTCTGGGGAGCCCGCAGATCCTCGGTC-3'
EchemAE114Srev	5'-GACCGAGATCTGCGGGCTCCCCAGAACCAGTGAATC-3'
EchemAA338Stopfor	5'-GCGTGGCTGCGATA <u>AA</u> CAAAGCGCCAGCGAAAC-3'
EchemAA338Stoprev	5'-GTTTCGCTGGCGCTTTG <u>TT</u> ATCGCAGCCACGC-3'

^a Die neu eingeführten Basen für den entsprechenden Aminosäureaustausch sind durch Unterstreichung hervorgehoben.

2.5.9 *In vivo* Transkription und Reinigung von *Escherichia coli* tRNA^{Glu}

Die Transkription des tRNA^{Glu}-Gens erfolgte konstitutiv vom Vektor pKR15 im *E. coli* Stamm DH5α.

2.5.9.1 Zellkultur

Von einer Einzelkolonie frisch transformierter DH5α/pKR15-Zellen wurde eine Übernachtskultur angeimpft. Mit dieser Vorkultur wurden acht 1000 ml-Schikanekolben mit jeweils 500 ml LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin im Verhältnis 1:100 angeimpft, über Nacht bis zu einer OD₅₇₈ von 5 bei 37°C und 200 rpm inkubiert und durch Zentrifugation (10 min, 5000 rpm, 4 °C, GSA-Rotor) geerntet.

2.5.9.2 Isolation der Nucleinsäuren

Die Zellen aus 4 l Kultur (ca. 19 g Naßgewicht) wurden mit 80 ml PBS gewaschen, anschließend in 80 ml Tris/Mg-Puffer resuspendiert, mit 80 ml Phenol (pH 4.5) versetzt und für 30 min bei Raumtemperatur kräftig geschüttelt und zur Phasentrennung zentrifugiert (4 min, 2000 rpm, 4 °C). Die untere Phenolphase und die Interphase wurden verworfen und die obere wäßrige Phase erneut mit einem Volumenteil Phenol versetzt, 3 min geschüttelt, zentrifugiert, hierauf die wäßrige Phase bis zu einer Endkonzentration von 300 mM mit NaOAc (pH 5.2) und einem Volumenteil 2-Propanol versetzt und die gefällte RNA durch Zentrifugation (15 min, 8500 rpm, 4 °C) sedimentiert. Das Pellet wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen und zur Deacylierung der tRNA's für 30 min bei 37 °C in 3 ml 200 mM Tris-Acetat (pH 9.0) inkubiert. Der Reaktionsansatz wurde mit 2.5 Volumenteilen Ethanol versetzt und zentrifugiert (15 min, 8500 rpm, 4 °C). Das so erhaltene Pellet (tRNA-Pool) wurde mit 70 % (v/v) Ethanol gewaschen, in 6 ml H₂O resuspendiert und zentrifugiert (30 min, 60,000 rpm, 4 °C, Ti70.1-Rotor, L7-65). Die Nucleinsäurekonzentration wurde durch Messung der A₂₆₀ bestimmt und der klare Überstand bei –25 °C gelagert.

2.5.9.2.1 Lösungen zur Isolation der Nucleinsäuren

PBS	NaCl	137 mM
	KCl	2.2 mM
	Na ₂ HPO ₄	10 mM
	KH ₂ PO ₄	1.7 mM
Tris/Mg-Puffer	Tris-HCl (pH 8.0)	20 mM
	Magnesiumacetat	20 mM

2.5.9.3 Chromatographische Anreicherung von tRNA^{Glu}

Die 6 ml tRNA-Lösung (ca. 35 mg tRNA) wurde auf eine mit Puffer A äquilibrierte MonoQ HR10/10 Säule mit einer Flußrate von 4 ml/min aufgetragen. Die Elution erfolgte mit einem linearen Salzgradienten von 400 bis 800 mM NaCl in Puffer A über 30 V_t (240 ml). Die tRNA^{Glu} enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt, bei Bedarf zur Konzentrierung präzipitiert und bei –25 °C gelagert.

2.5.9.3.1 Lösung zur Chromatographische Anreicherung von tRNA^{Glu}

Puffer A	MOPS (pH 6.2)	20 mM
	MgCl ₂	15 mM

2.6 Proteinproduktion

2.6.1 Rekombinante Produktion und chromatographische Reinigung der *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Synthetase

Die rekombinante Darstellung der GluRS wurde nach der Methode von Lin *et al.*, 1992 vorgenommen. Abweichend hiervon diente der *E. coli* Stamm DH10 β anstelle von DH5 α als Produktionswirt.

2.6.1.1 Zellkultur

Von einer Einzelkolonie frisch transformierter DH10 β /pLQ7612-Zellen wurde eine Übernachtskultur angeimpft. Mit dieser Vorkultur wurden acht 1000 ml-Schikanekolben mit jeweils 500 ml LB-Medium und 100 μ g/ml Ampicillin im Verhältnis 1:100 angeimpft und bis zu einer OD_{578nm} von 0.2 bei 32 °C und 200 rpm inkubiert. Die Induktion erfolgte durch die Inkubation der Kulturen bei 43 °C und 200 rpm für 50 min. Anschließend wurden die Zellen bei 37° C und 200 rpm bis zu einer OD_{578nm} von 0.8 inkubiert, durch Zentrifugation geerntet (10 min, 5000 rpm, 4 °C, GSA-Rotor, RC-5B) und bei -80°C gelagert.

2.6.1.2 Zellaufschluß

2.5 g Naßzellen wurden in 10 ml GluRS-Aufschlußpuffer resuspendiert. Der Zellaufschluß wurde mittels Ultraschall (12 min; 70 % Amplitude; 0.5 sec Puls; 0.5 sec Pause; Sonoplus HD 2070, Bandelin; KE76) in einem eisgekühlten 50 ml Plastik-Gefäß durchgeführt. Die entstandene Suspension wurde bei 12000 g (18,000 rpm, SS34, RC-5B) und 4 °C für 45 min zentrifugiert, um die Zelltrümmer abzutrennen.

2.6.1.3 Zwei-Phasen-Verteilung

Für die Zwei-Phasen-Verteilung wurden die ca. 11 ml Überstand mit 1.4 g Polyethylenglycol 8000 und 0.3 g Dextran T500, gelöst in ca. 7 ml 20 mM Tris-HCl (pH 7.8) und 10 % Glycerin, versetzt. Anschließend wurde mit 20 mM Tris-HCl (pH 7.8) und 10 % Glycerin auf 20 ml aufgefüllt. Zur Herstellung einer homogenen Lösung wurde dieser Ansatz für 1 h bei 4 °C geschüttelt. Die Trennung der zwei Phasen fand durch nachfolgende Zentrifugation (Sorvall, SS34, 18,000 rpm, 15 min; 4 °C) statt. Die GluRS war nach der Zentrifugation in der oberen Phase angereichert.

2.6.1.4 Anionenaustauschchromatographie an MonoQ

Die obere der zwei Phasen (~15 ml) wurde erneut zentrifugiert (Sorvall SS34 16,000 rpm; 10 min; 4 °C) und anschließend mit GluRS-Puffer A auf 50 ml verdünnt. Im zweiten Reinigungsschritt wurden diese 50 ml (ca. 1 mg/ml Protein) auf eine MonoQ HR 10/10, die zuvor in GluRS-Puffer A äquilibriert wurde, mit einer Flussrate von 3 ml/min aufgetragen. Zur Abtrennung von Verunreinigungen wurde die Säule als nächstes mit GluRS-Puffer A gewaschen. Die Elution der Proteine erfolgte anschließend durch einen linearen NaCl-Gradienten von 0-500 mM NaCl über 200 ml mit 4 ml/min. Die GluRS enthaltenden Fraktionen (Fraktionsgröße 5 ml) wurden vereinigt (~10 ml mit ca. 2 mg/ml Protein) und in einem Ultrafree-15 (Ausschlußgrenze 10,000) bei 4 °C und 5000 rpm (Eppendorf, Centrifuge 5403, A-4-44) in 40 min auf 580 µl bis zu einer Proteinkonzentration von 25 mg/ml angereichert.

2.6.1.5 Gelpermeationschromatographie

Eine Superdex 200 HR10/30 Säule ($V_t=24$ ml) wurde mit GluRS-Puffer C bei einer Flußrate von 0.4 ml/min äquilibriert. Die konzentrierte GluRS-Lösung wurde aufgetragen, die Proteine isokratisch eluiert und die GluRS enthaltenden Fraktionen vereinigt. Die homogene GluRS wurde durch Ultrafiltration bis zu einer Endkonzentration von 11 mg/ml konzentriert und bei Bedarf nach Zusatz von Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 50 % (v/v) bei -25 °C gelagert.

2.6.1.6 Lösungen zur Präparation der *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Synthetase

GluRS-Aufschlußpuffer	Tris-HCl (pH 7.8)	20 mM
	Glycerin	10 % (w/v)
	EDTA	100 µM
	DTT	3 mM
	Proteaseinhibitor	½ Tablette/10 ml
GluRS-Puffer A	Tris-HCl (pH 7.8)	20 mM
	Glycerin	10 % (w/v)
	DTT	200 µM
GluRS-Puffer B	Tris-HCl (pH 7.8)	20 mM
	Glycerin	10 % (w/v)
	DTT	200 µM
	NaCl	1 M
GluRS-Puffer C	HEPES (pH 7.2)	20 mM
	Glycerin	20 % (v/v)
	DTT	1 mM

2.6.2 Rekombinante Produktion und chromatographische Reinigung der *Escherichia coli* Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase

2.6.2.1 Zellkultur

Von einer Einzelkolonie frisch transformierter BL21(DE3)/pLIpopC-Zellen wurde eine Übernachtskultur angeimpft. Mit dieser Vorkultur wurden zehn 1000 ml-Schikanekolben mit jeweils 500 ml LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin im Verhältnis 1:100 angeimpft und bis zu einer OD_{578nm} von 0.7 bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Induktion der *hemL*-Expression erfolgte durch Zugabe von 0.4 mM IPTG unter erneutem Zusatz von 100 µg/ml Ampicillin. Die Zellen wurden nach 3 h bei einer OD_{578nm} von 2.5 durch Zentrifugation geerntet (10 min, 5000 rpm, 4 °C, GSA-Rotor, RC-5B) und bei –80 °C gelagert.

2.6.2.2 Zellaufschluß

6 ml Naßzellen wurden in 6 ml GSA-AM-Aufschlußpuffer resuspendiert, für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert und durch Ultraschall (KE76; 70 % Amplitude; 4 min, 0.5 s Puls, 0.5 s Pause) unter externer Eiskühlung aufgeschlossen. Der Zellextrakt wurde anschließend zentrifugiert (45 min, 65,000 rpm, 4 °C, Ti70.1-Rotor, L7-65) und der Überstand über Nacht bei 4 °C gegen GSA-AM-Puffer A dialysiert.

2.6.2.3 Anionenaustauschchromatographie an MonoQ

Das Dialysat wurde durch einen Membranfilter (Porengröße 0.2 µm) filtriert und auf eine mit GSA-AM-Puffer A äquilibrierte MonoQ HR10/10 Säule mit einer Flußrate von 1 ml/min aufgetragen. Nach dem Waschen der Säule mit 5 V_t GSA-AM-Puffer A erfolgte die Elution der Proteine mit einem linearen Salzgradienten von 10 bis 1000 mM KCl in GSA-AM-Puffer A über 20 V_t (160 ml) bei einer Flußrate von 4 ml/min. Die GSA-AM enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration (MWCO 10,000) konzentriert.

2.6.2.4 Präparative Gelpermeationschromatographie

Eine Superdex 200 XK26/60 Säule (V_t=310 ml) wurde mit GSA-AM-Puffer B bei einer Flußrate von 2 ml/min äquilibriert. Die konzentrierte GSA-AM-Lösung (2 ml, ca. 22 mg Protein/ml) wurde aufgetragen, die Proteine isokratisch eluiert und die GSA-AM enthaltenden Fraktionen vereinigt. Die homogene GSA-AM wurde durch Ultrafiltration bis zu einer Endkonzentration von 11 mg/ml konzentriert und bei Bedarf nach Zusatz von Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 50 % (v/v) bei -25 °C gelagert.

2.6.2.5 Lösungen zur Präparation der *Escherichia coli* Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase

GSA-AM-Aufschlußpuffer	Tris-HCl (pH 7.9)	100 mM
	DTT	10 mM
	EDTA	1 mM
	Proteaseinhibitor	½ Tablette/10 ml
	DNAse II	100 µg/ml

	RNase	100 µg/ml
	Lysozym	200 µg/ml
GSA-AM-Puffer A	HEPES (pH 7.9)	20 mM
	KCl	10 mM
	DTT	3 mM
	Glycerin	3 % (v/v)
GSA-AM-Puffer B	HEPES (pH 7.9)	20 mM
	NaCl	20 mM
	DTT	10 mM

2.6.3 Rekombinante Produktion, Renaturierung und chromatographische Reinigung der *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase

2.6.3.1 Zellkultur

Von einer Einzelkolonie BL21(λDE3)-Zellen, die frisch mit dem GluTR codierenden Plasmid (WT bzw. die erzeugten Mutanten) transformiert worden war, wurde eine Übernachtskultur von 150 ml LB-Medium mit 100 µg/ml Ampicillin angeimpft. Mit dieser Vorkultur wurden vier 1000 ml-Schikanekolben mit jeweils 500 ml LB-Medium und 100 µg/ml Ampicillin im Verhältnis 1:100 angeimpft und bis zu einer OD_{578nm} von 0.7 bei 37 °C und 200 rpm inkubiert. Die Induktion der Proteinproduktion erfolgte durch Zugabe von 0.25 mM IPTG, außerdem wurde zu diesem Zeitpunkt zusätzlich Ampicillin bis zu einer Endkonzentration von 100 µg/ml hinzugegeben. Nach zwei Stunden Induktion wurden die Zellen zentrifugiert (Sorvall, SLA 3000, 5000 rpm; 10 min; 4 °C) und das Zellsediment in 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) resuspendiert. Die Suspension wurde in 50 ml Plastik-Röhrchen überführt, nochmals zentrifugiert (Eppendorf, Centrifuge 5403, A-4-44, 5000 rpm; 10 min; 4 °C) und die sedimentierten Zellen bei –20 °C gelagert.

2.6.3.2 Zellaufschluß und Reinigung der Inclusion Bodies

Zur Isolierung von Inclusion Bodies wurden je 3.2 g Zellen (Naßgewicht) aus 2 l Kultur in 10 ml GluTR-Aufschlußpuffer resuspendiert. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT erfolgte der Zellaufschluß mittels Ultraschall (0.5 s Puls, 0.5 s Pause, 70 % Amplitude; KE76; Sonoplus HD 2070, Bandelin). Die entstandene Suspension wurde in Zentrifugenbecher (SS34) überführt und zentrifugiert (Sorvall, SS34, 20,000 rpm; 10 min; 4 °C). Im nächsten Reinigungsschritt wurde das

Sediment zwei mal mit 20 ml GluTR-Isolierungspuffer gewaschen, indem es durch Ultraschall (0.5 s Puls, 0.5 s Pause, 70 % Amplitude; KE76) resuspendiert und anschließend zentrifugiert (Sorvall, SS34, 10,000 rpm; 10 min; 4 °C) wurde. Das Sediment wurde im letzten Schritt mit 20 ml 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) gewaschen und die so gereinigten Inclusion Bodies wurden bei -20 °C gelagert.

2.6.3.2.1 Lösungen zur Reinigung der Inclusion Bodies

GluTR-Aufschlusspuffer	Tris-HCl (pH 8.0)	100 mM
	Lysozym	0.2 mg/ml
GluTR-Isolierungspuffer	Harnstoff	2 M
	Tris-HCl (pH 8.0)	20 mM
	NaCl	500 mM
	Triton X-100	0.2 % (w/v)

2.6.3.3 Renaturierung der Glutamyl-tRNA Reduktase aus Inclusion Bodies an Nickel-IDA-Sepharose

Die Inclusion Bodies wurden in 200 Volumenteilen ihres Naßgewichtes Puffer S resuspendiert, zur Abtrennung von unlöslichen Anteilen zentrifugiert (Sorvall, SS34, 20,000 rpm; 15 min; 4 °C) und auf 40 ml mit Puffer S äquilibrierte und Ni²⁺-beladene Chelating Sepharose Fast Flow in einer XK26/20 Säule mit einer Flussrate von 6 ml/min aufgetragen. Zum Entfernen von nicht gebundenem Protein wurde die Säule mit Puffer F mit der gleichen Flussrate gewaschen. Die Rückfaltung der auf der Säule gebundenen Proteine erfolgte durch einen Austausch von Puffer F (6 M Harnstoff) zu Puffer W (0 M Harnstoff) über einen linearen Gradienten über 30 V_t bei einer Flussrate von 1.2 ml/min. Anschließend wurden die Proteine durch Puffer E mit 5 ml/min von der Säule eluiert und fraktioniert.

2.6.3.3.1 Lösungen zur Renaturierung der *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase

Puffer S	Guanidinium-HCl	6 M
	Tris-HCl (pH 8.0)	20 mM
	NaCl	500 mM
	β-ME	5 mM

Puffer F	Harnstoff	6 M
	Tris-HCl (pH 8.0)	20 mM
	NaCl	500 mM
	β -ME	5 mM
Puffer W	Tris-HCl (pH 8.0)	20 mM
	NaCl	500 mM
	Glycerin	20 % (v/v)
	β -ME	5 mM
Puffer E	Tris-HCl (pH 8.0)	20 mM
	NaCl	500 mM
	Imidazol	500 mM
	Glycerin	20 % (v/v)
	β -ME	5 mM
	CHAPS	0.5 mM

2.6.3.4 Trennung von Glutamyl-tRNA Reduktase Dimeren und unspezifischen Proteinaggregaten durch Gelpermutationschromatographie

Die GluTR enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt (~10 ml) und unverzüglich auf eine Superdex 200 HR 26/60 Säule ($V_t=310$ ml) der Firma Amersham, die zuvor mit GPC-Puffer äquilibriert wurde, aufgetragen. Die Abtrennung der aggregierten von den nativen Proteinen erfolgte bei einer Flussrate von 2.5 ml/min. Fraktionen, die native, aggregatfreie GluTR enthielten, wurden vereinigt, durch Ultrafiltration (Ultrafree-15, MWCO 10,000) konzentriert und in 25 μ l Portionen bei -80 °C gelagert.

2.6.3.4.1 Lösung für die Gelpermeationschromatographie

GPC-Puffer	HEPES (pH 8.0)	20 mM
	NaCl	200 mM
	Glycerin	20 % (v/v)
	CHAPS	0.5 mM
	DTT	5 mM

2.6.4 Konzentrierung von Proteinlösungen

Zur Konzentrierung von Proteinlösungen wurden je nach Anfangsvolumen Centricon-10 (max. 2 ml) bzw. Ultrafree-15 (max. 12 ml) Ultrafiltrationsmembrankonzentratoren nach Angaben des Herstellers verwendet. Die Ausschlussgrenzen lagen je nach Protein bei ca. 10, 30 oder 50 kDa.

2.6.5 Dialyse

Zur Entsalzung und Umpufferung wurden die entsprechenden Lösungen bei einem Volumen kleiner als 100 µl auf Membranfiltern (Porengröße 25 nm), bei Volumina von 0.1 bis 1 ml in Dialyseknöpfen und bei größeren Volumina in Dialyseschläuchen für 20 min (Membranfilter) bzw. über Nacht bei 4 °C gegen mindestens 100 Volumenteile des gewünschten Puffers dialysiert. Die Ausschlussgrenze der verwendeten Dialyseschläuche betrug ca. 12 kDa.

2.7 Proteincharakterisierung

2.7.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-PAGE wurde nach der Standardmethode nach Laemmli, 1970 durchgeführt. Es wurden Minigele (BioRad) mit einem Acrylamidgehalt von 7-15 % (Trenngel) bzw. 5 % (Sammelgel) verwendet.

2.7.1.1 Lösungen zur SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Angaben für ein Minigel:

Acrylamid-Stammlösung	Acrylamid	30 % (w/v)
	Bisacrylamid	0.8 % (w/v)
Trenngel (12 %ig, w/v)	Acrylamid-Stammlösung	2 ml
	1.5 M Tris-HCl (pH 8.8)	
	mit 0.4 % (w/v) SDS	1.25 ml
	dest. Wasser	1.75 ml

Sammelgel (5 %ig, w/v)	APS (10 %)	50 µl
	TEMED	5 µl
	Acrylamid-Stammlösung	500 µl
	500 mM Tris-HCl (pH 6.8)	
	mit 0.4 % (w/v) SDS	625 µl
Elektrophoresepuffer	dest. Wasser	1.375 ml
	APS (10 %)	25 µl
	TEMED	2.5 µl
	Glycin	380 mM
	Tris-HCl	50 mM
SDS-Probenpuffer	SDS	0.1 % (w/v)
	Tris-HCl (pH 6.8)	100 mM
	Glycerin	40 % (v/v)
	β-ME	10 % (v/v)
	SDS	3.2 % (w/v)
Färbelösung	Bromphenolblau	0.2 % (w/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)
	Ethanol	30 % (v/v)
	Coomassie Brilliant Blau	0.25 % (v/v)
Entfärbelösung	Ethanol	30 % (v/v)
	Essigsäure	10 % (v/v)

2.7.2 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Konzentration einer gereinigten Proteinlösung kann bei bekannter Aminosäurezusammensetzung des Proteins mit der Methode von Gill und von Hippel bestimmt werden (Gill & von Hippel, 1989). Die Aminosäuren Tryptophan, Tyrosin und Cystein absorbieren bei 280 nm. Aus der Häufigkeit dieser Aminosäuren im Protein kann der dekadische Extinktionskoeffizient ϵ_{280} mit folgender Gleichung berechnet werden:

$$\epsilon_{280} = (n_{\text{Trp}} \cdot 5690 + n_{\text{Tyr}} \cdot 1280 + n_{\text{Cys}} \cdot 120) \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$$

n_x = Anzahl der betreffenden Aminosäuren im Protein

ϵ_x = Extinktionskoeffizient der jeweiligen Aminosäure bei 280nm

ϵ_{280} = molekularer dekadischer Extinktionskoeffizient bei 280nm

Mit Hilfe des dekadischen Extinktionskoeffizienten kann nun die Proteinkonzentration c der untersuchten Lösung berechnet werden:

$$c[\text{mg/ml}] = M_r \cdot A_{280} / \epsilon_{280} \cdot d \quad (d = \text{Schichtdicke der Küvette [cm]})$$

Eine Überprüfung der spektroskopisch bestimmten Proteinkonzentrationen erfolgte unter Verwendung des BCA-Tests der Firma Pierce nach Herstellerangaben.

2.7.3 Analytische Gelfiltration

Eine 24 ml Superdex 200 HR10/30 Gelpermeationssäule wurde mit dem entsprechenden Puffer bei einer Flussrate von 0.5 ml/min äquilibriert. Zur Eichung wurden Markerproteine mit bekanntem M_r (Thyroglobulin 669,000; Apoferritin 443,000; β -Amylase 200,000; Alkoholdehydrogenase 150,000; Ovalbumin 45,000; Carboanhydrase 29,000 und Ribonuklease A 13,700) auf die Säule aufgetragen und ihre Elutionsvolumina spektroskopisch verfolgt. Zur Bestimmung der nativen molekularen Masse wurden analoge Experimente mit der GluTR durchgeführt.

2.7.4 N-terminale Proteinsequenzierung

Die Proteinsequenzierung wurde von Dr. E. Schiltz an der Universität Freiburg durchgeführt.

2.7.5 MALDI-Massenspektrometrie

Die MALDI-MS wurde von Dr. L. Jensch an der GBF Braunschweig durchgeführt.

2.7.6 Zirkularer Dichroismus (CD)

Die CD-Spektroskopie ist eine Form der Absorptionsspektroskopie, in der die unterschiedlichen Absorptionen von rechts- und links-gerichtet-zirkular-polarisiertem Licht, das durch eine optisch aktive Substanz verursacht wurde, gemessen wird. Dafür wird eine linear polarisierte Strahlung in die zwei zirkular polarisierten Anteile aufgespalten und durch die Probe gelenkt. Wenn nun einer der beiden Anteile stärker durch die Probe absorbiert wird als der andere, entsteht bei der nachfolgenden Vereinigung der Anteile eine elliptisch

polarisierte Strahlung. Wenn keiner der beiden Teile absorbiert wird, entsteht wieder die linear polarisierte Strahlung. Das CD-Spektrum wird erstellt, indem dieser Dichroismus als Funktion der Wellenlänge aufgezeichnet wird. Anhand von CD-Spektren können verschiedene Bestandteile einer Proteinstruktur bestimmt werden. So können im fernen UV-Bereich (240 bis 180 nm) Aussagen über die Sekundärstruktur des Proteins gemacht werden, da in diesem Bereich die Peptidbindung die absorbierende Gruppe ist. Ein Beispiel hierfür ist die Abschätzung des Gehalts an α -helikalen Bereichen, da diese in CD-Spektren charakteristische Minima bei 208 und 220 nm aufweisen. Die Elliptizität bei 220 nm wird signifikant durch die Länge der α -Helices und die Dynamik des Proteins beeinflusst. Im nahen UV-Bereich (250 bis 290 nm) absorbieren die Seitenketten der aromatischen Aminosäuren Phenylalanin, Tyrosin und Tryptophan, die durch die Tertiärstruktur des Proteins in asymmetrische Umgebung versetzt werden und die CD-Spektren so verschiedene für das Protein charakteristische Merkmale aufweisen.

Die zu vermessenden Proteinlösungen wurden gegen 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) und 10 mM NaCl dialysiert. Die Spektren der Proteinlösungen (0.4 mg/ml) wurden in Quarzküvetten mit 1 mm Weglänge auf einem Jasco J-810 Spektropolarimeter in einem Wellenlängenbereich von 190 bis 250 nm aufgenommen. Drei Spektren wurden von jeder Probe gemessen und dann die Spektren akkumuliert. Als Hintergrund diente der Dialysepuffer, der von den Spektren subtrahiert wurde.

2.8 Glutamyl-tRNA Reduktase Aktivitätstests

2.8.1 Herstellung des Substrates *Escherichia coli* [^{14}C]Glu-tRNA^{Glu}

Zur Aminoacylierung von 100-200 μg *E. coli* tRNA^{Glu} wurde die tRNA^{Glu} in einem Ansatz mit 0.5 μM GluRS, 4 mM ATP und 35 μM [^{14}C]Glutamat (10 μCi) in einem Volumen von 1 ml in GluRS-Assay-Puffer für 20 min bei 37 °C und 500 rpm inkubiert. Die verschiedenen Komponenten wurden bei Raumtemperatur zusammengegeben. Der Reaktionsstart erfolgte durch die Zugabe des Enzyms und durch die Erwärmung des Ansatzes auf 37 °C.

2.8.2 Herstellung des misacylierten Substrates *Escherichia coli* [^{14}C]Gln-tRNA^{Glu}

Die Bedingungen für die Misacylierung von *E. coli* tRNA^{Glu} mit [^{14}C]Gln wurden im Rahmen der Diplomarbeit von Corinna Lürer in unserem Labor erarbeitet (Lürer, 2003). Als beste Bedingung wurde folgender Ansatz ermittelt: Zur Misacylierung von tRNA^{Glu} mit [^{14}C]Glutamin wurden 2 μM *E. coli* tRNA^{Glu} mit 25 μM [^{14}C]Gln, 4 mM ATP und 15 μM GluRS in 1 ml GluRS-Assay-Puffer für 1 h bei 37 °C inkubiert.

2.8.3 Lösungen zur Substratherstellung

GluRS-Assay-Puffer	HEPES (pH 7.0)	50 mM
	MgCl ₂	15 mM
	KCl	25 mM
	DTT	3 mM

2.8.4 Reinigung aminoacylierter tRNA

Die Reinigung der markierten Substrate *E. coli* [^{14}C]Glu-tRNA^{Glu} und [^{14}C]Gln-tRNA^{Glu} erfolgte durch die Extraktion des Reaktionsansatzes mit einem Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol-Gemisch (25:24:1) (PCI) in 10 ml Plastik-Gefäßen. Um die Hydrolyse der Aminoacylbindung während der Aufarbeitung zu verhindern, wurde H₂O gesättigtes Phenol mit einem pH-Wert von 4.5-5.0 verwendet. Alle Schritte wurden mit gekühlten Lösungen und so zügig wie möglich durchgeführt.

Der Reaktionsansatz (1 ml) wurde zunächst mit 4 ml 375 mM NaOAc (pH 5.2) versetzt, gemischt und dann zur Extraktion zu 5 ml PCI gegeben und kräftig geschüttelt. Durch eine Zentrifugation (Eppendorf, Centrifuge 5403, A-4-44, 5000 rpm; 4 °C; 1 min) erfolgte die Phasentrennung. Die obere (wässrige) Phase wurde zur weiteren Extraktion mit 5 ml Chloroform versetzt und erneut kräftig gemischt (Abtrennung letzter Phenolreste und denaturierter Proteine). Nach wiederholter Zentrifugation wurde die wässrige Phase abgenommen und auf 10 Eppendorfgefäße (2 ml) verteilt. Anschließend erfolgte die Fällung der aminoacylierten tRNA durch Zugabe von 3 Volumenteilen 96 % Ethanol. Die gefällte tRNA wurde durch Zentrifugation (Eppendorf, MiniSpin, 13400 rpm; 25 min; 4 °C) geerntet. Der Überstand wurde abgenommen und die tRNA durch 5-10 min Vakuumzentrifugation in

der Speed-Vac getrocknet. Die getrocknete tRNA wurde in 100 µl 30 mM Natriumacetat (pH 4.9) aufgenommen und bei -25 °C gelagert.

2.8.5 Glutamyl-tRNA Reduktase Aktivitätstest

Bei dem verwendeten GluTR-Enzymtest wird die Abnahme des Substrates [^{14}C]Glu-tRNA^{Glu} bzw. [^{14}C]Gln-tRNA^{Glu} verfolgt. Der Test beruht auf der Präzipitation des [^{14}C]-markierten Substrates und der anschließenden Quantifizierung durch Szintillationszählung (Hoben *et al.*, 1985).

In einem 80 µl Ansatz wurden 0.3 mg/ml BSA, 2 mM NADPH und verschiedene Mengen (für einen Aktivitätsvergleich 150-200 nM) *E. coli* GluTR in GluTR-Assay-Puffer für 45 s bei 37 °C inkubiert. Der Reaktionsstart erfolgte durch Zugabe von Substrat in 5-10 fachem molaren Überschuß zum Enzym (0.5-2 µM). Anschließend wurde der Ansatz weiter bei 37 °C und 500 rpm inkubiert und zu verschiedenen Zeitpunkten (meist 10, 40, 70 und 100 s) je 15 µl Proben genommen. Diese wurden auf einen halbierten Whatman 3MM-Filter pipetiert und zum Abstoppen der Reaktion zügig in 10 % Trichloressigsäure überführt. Zur Abtrennung von freiem [^{14}C]Glu und GSA wurden die Filter innerhalb von 15 min bei Raumtemperatur erneut in 10 % TCA, dann in 5 % TCA und zuletzt in 96 % Ethanol gewaschen und anschließend für 15 min getrocknet. Die trockenen Filter wurden dann in 4 ml Szintillationsflüssigkeit überführt und die Proben je 20 min im Zählgerät ausgezählt. Für die Bestimmung der spezifischen Aktivität wurden die Anfangsgeschwindigkeiten der GluTR-Reaktion bei 20-fachem Substratüberschuss aus den Zeitpunkten berechnet, zu welchen 50 % des Substrates umgesetzt waren.

2.8.6 Lösungen für den Glutamyl-tRNA Reduktase Aktivitätstest

GluTR-Assay-Puffer	HEPES (pH 8.1)	50 mM
	MgCl ₂	20 mM
	KCl	20 mM
	DTT	3 mM
	Glycerin	20 % (v/v)

2.8.7 Identifizierung der Glutamyl-tRNA Reduktase Reaktionsprodukte

Glutamat, GSA und ALA können durch Reversed-Phase-Chromatographie auf einer Waters BondpackTM C₁₈-Säule (3.9 x 150 mm, 125 Å Porengröße, 10 µm Partikeldurchmesser) getrennt werden.

Die bei -25 °C gelagerten Ansätze der Aktivitätstest wurden aufgetaut und zum Teil (15-20 µl) zur Überführung von GSA in ALA mit 2 µl (10 mM) PLP und 1 µl GSA-AM (7.7 mg/ml) versetzt und für 15 min bei 37 °C und 500 rpm inkubiert. Damit wird durch die GluTR produziertes GSA durch seine Reaktion mit dem Folgeenzym GSA-AM identifiziert. Die Ansätze wurden dann mit Wasser auf 90 µl aufgefüllt und es wurde zur Fällung der Proteine und der tRNA 10 µl 10 % PCA hinzugefügt, geschüttelt und die Proben für 15 min auf Eis belassen. Anschließend wurden die Ansätze bei 4 °C, 13400 rpm für 30 min in einer Tischzentrifuge (Eppendorf, MiniSpin) zentrifugiert. Der so erhaltene Überstand wurde abgenommen und für die HPLC in Probengefäße überführt.

Je Probe wurden 40 µl auf die Säule aufgetragen. Die Elution erfolgte mit HPLC-Puffer bei einem Druck von etwa 50 bar und einer Flussrate von 1 ml/min. Die radioaktiven Substanzen wurden dabei mit einem Durchfluß-Szintillationszähler (Ramona) detektiert. Zuvor wurden durch Eichläufe mit reinem [¹⁴C]Glu und [¹⁴C]ALA unter identischen Bedingungen die Retentionszeiten dieser Substanzen ermittelt.

2.8.8 Lösung für die HPLC

HPLC-Puffer	NaH ₂ PO ₄ (pH 3.0 mit H ₃ PO ₄ eingestellt)	50 mM
	SDS	5 mM
	tert-Amylalkohol	1 % (v/v)

2.8.9 Chemische Modifikation der Glutamyl-tRNA Reduktase

0.2 µM GluTR wurde mit folgenden Reagenzien in GluTR-Assay-Puffer für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert: Iodacetamid, N-Tosyl-L-phenylalanin-chlormethylketon und 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure. Anschließend wurde die Aktivität der GluTR mit Hilfe des Standard-Depletionstests ermittelt und mit der Aktivität einer unbehandelten GluTR-Fraktion verglichen. Die Produktbildung wurde durch HPLC-Analyse nachgewiesen.

2.8.10 Inhibition der Glutamyl-tRNA Reduktase durch Chelatisierungsreagenzien, Metallionen und potentielle Substratanaloga

Die Untersuchung der GluTR-Aktivität erfolgte unter Verwendung des Standard-Depletionstests. Die Lösungen der eingesetzten Reagenzien wurden auf pH 8.1 eingestellt und 15 min vor dem Start der Reaktion bei Raumtemperatur zugegeben. Parallel wurden jeweils Aktivitätstests in Abwesenheit des Enzyms durchgeführt und die so ermittelte spontane Substrathydrolyse unter den entsprechenden Testbedingungen wurde als Blindwert bei der Bestimmung der tatsächlichen GluTR-Aktivität berücksichtigt. Die Produktbildung wurde durch HPLC-Analyse nachgewiesen.

2.9 Kristallisationsversuche mit der *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase

Für die Kristallisationsexperimente wurden ausschließlich frisch präparierte, durch Gelfiltration gereinigte Proteine verwendet. Zur Kristallisation wurde die “Sitting-Drop“-Methode angewendet. Hierbei wird dem Protein im Tropfen über die Gasphase langsam Wasser entzogen, so dass es zu einer Übersättigung der Proteinlösung kommt. Durch Verwendung geeigneter Fällungsmittel wie anorganischen Salzen, organischen Lösungsmitteln oder Polyethylenglykolen kann es im Idealfall zur Kristallisation des Proteins kommen. Das Reservoir wird mit 150 µl Fällungsmittel enthaltender Puffer-Lösung befüllt. 3 µl dieser Pufferlösung wurden dann mit 3 µl einer Protein enthaltenden, gepufferten Proteinlösung auf einem Plastikplättchen zu dem Tropfen vereinigt. Durch die Vereinigung von jeweils 3 µl an Protein-Lösung und Reservoir-Lösung im Tropfen ist die Konzentration des Fällungsmittels zu Beginn des Kristallisationsexperiments halbiert worden. Das führt zu einem Konzentrationsunterschied bezogen auf die Fällungsmittel zwischen Tropfen und Reservoirlösung. Dadurch kommt es zum Wasserentzug aus dem Tropfen über die Gasphase. Es wurden die Crystall Screens I und II, Crystall Screen Lite, MembFac und Cryo Screen eingesetzt. Diese Screen-Kits sind Produkte der Firma Hampton Research (Laguna Hills, USA). Die verwendeten Proteinlösungen wurden gegen 25 mM HEPES (pH 8.1), 200 mM NaCl, 20 % (v/v) Glycerin, 10 mM DTT und 0.5 mM CHAPS dialysiert und in Konzentrationen von 3.5-8 mg/ml eingesetzt. Den Lösungen wurden dann bei Bedarf bis zu

einer Endkonzentration von 0.32-1 mM NADPH, 0.18-0.32 mM PLP, 0.32-0.36 mM Glutamycin und/oder 0.32 mM Gabaculin zugegeben.

2.10 Nachweis des kovalenten Thioester-Zwischenproduktes

2 mM *E. coli* GluTR und 10 mM *E. coli* [^{14}C]Glu-tRNA^{Glu} wurden in 7 μl GluTR-Assay-Puffer bei 20 °C für 15 bzw. 60 s inkubiert. Es wurden jeweils drei Ansätze mit 2 mM NADPH und ohne NADPH getestet. Die Reaktion wurde durch Zugabe von 10 μl SDS-Probenpuffer gestoppt. Die Ansätze wurden für 2 min bei 95 °C inkubiert und mittels SDS-PAGE aufgetrennt. Nach dem Anfärben mit Coomassie Brilliant Blau wurden die Gele für 24 h einer Phosphorimage-Platte (Kodak Imaging Screen K) ausgesetzt. Hierbei wird durch die β^- -Strahlung des [^{14}C]Glu das Eu^{2+} in der BaFBr:Eu²⁺-Matrix der Phosphorimage-Platte zu Eu^{3+} oxidiert. Wird dieser angeregte Komplex dem Licht eines Helium-Neon Lasers mit einer Wellenlänge von 633 nm ausgesetzt, erfolgt die Reduktion des Eu^{3+} zu Eu^{2+*} . Durch Emission eines Photons (390 nm) kehrt das Eu^{2+*} aus seinem angeregten Zustand in seinen Grundzustand (Eu^{2+}) zurück. Wird die Intensität dieser Lumineszenz gemessen und in Bezug auf die Position des Laserstrahls gespeichert, resultiert hieraus ein quantitatives Abbild des durch die radioaktive Strahlung auf der Phosphorimage-Platte verursachten latenten Bildes. Die Auswertung der exponierten Platte wurde mit Hilfe des Molecular Imager FX (BioRad) durchgeführt.

2.11 Co-Immunopräzipitation

Kaninchen Anti-GluTR Serum und Kaninchen Anti-GSA-AM Serum wurde von Eurogentec (Belgien) produziert. Die Immunisierung erfolgte mit Lösungen der rekombinant produzierten und durch Gelfiltration gereinigten Proteine. Es wurden jeweils 1 mg *E. coli* GluTR in 20 mM HEPES (pH 8.0), 200 mM NaCl, 20 % (v/v) Glycerin, 0.5 mM CHAPS und 5 mM DTT bzw. 1 mg *E. coli* GSA-AM in 20 mM HEPES (pH 7.9), 20 mM NaCl und 10 mM DTT für die Immunisierung von 2 Kaninchen pro Antigen eingesetzt. Den Tieren wurden jeweils 125 μg Antigen in den oben angegebenen Puffern zusammen mit Freund's Adjuvanz nach 0, 14, 28 und 56 Tagen injiziert.

2.11.1 Entfernung von unspezifischen Antikörpern aus dem Kaninchen Anti-GluTR Serum

Die Zellen einer 20 ml Übernachtskultur des *E. coli hemA⁻* Stammes EV61 (Verkamp *et al.*, 1989) wurden einmal mit PBS gewaschen, in 5 ml Towbin-Puffer resuspendiert, für 5 min bei RT inkubiert, abzentrifugiert, in 1 ml Towbin-Puffer resuspendiert und in ein 1.5 ml Eppendorfgefäß überführt. Nach dem Zentrifugieren wurde das Sediment mit 1 ml CHCl₃ versetzt, für 1 min kräftig geschüttelt und abzentrifugiert. Die über der Chloroform-Phase befindliche Substanz wurde isoliert und mit 200 µl Kaninchen Anti-GluTR Serum für 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach der Zentrifugation (4 °C, 15 min, 13,000 rpm) wurde der klare Serumüberstand abgenommen und bei -25 °C gelagert.

2.11.2 *In vivo* Co-Immunopräzipitation

Ca. 0.5 g, bei einer OD₅₇₈ von 0.7 geerntete, *E. coli* BL21(DE3) Zellen wurden in 5 ml Aufschlußpuffer resuspendiert und durch Ultraschall (KE76; 70 % Amplitude; 2 min, 0.5 s Puls, 0.5 s Pause) unter externer Eiskühlung aufgeschlossen. Der Zellextrakt wurde anschließend zentrifugiert (30 min, 40,000 rpm, 4 °C, Ti70.1-Rotor, L7-65). Je 300 µl des Zellextraktes wurden mit 2 µl des jeweiligen Serums versetzt und für 90 min bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurden je Ansatz 15 µl einer 1:1 Aufschlammung von in Aufschlußpuffer äquilibrierter Protein A Sepharose mit Aufschlußpuffer zugegeben und für weitere 90 min bei 4°C unter Schütteln inkubiert. Nach der Zentrifugation der Ansätze für 60 s bei 13,000 rpm und 4°C wurden die Pellets drei mal mit je 300 µl Waschpuffer gewaschen. Die gewaschenen Pellets wurden mit je 15 µl SDS-Probenpuffer versetzt, für 5 min bei 96 °C inkubiert und die Proteine mittels SDS-PAGE aufgetrennt und durch Elektro-Blotting auf eine PVDF-Membran transferiert. Durch Ponceau S Färbung wurden die Markerproteine identifiziert und markiert. Hierauf wurde die Membran für 15 h bei RT mit Blockierlösung inkubiert, drei mal für je 5 min mit PBS gewaschen und für 1.5 h bei RT auf dem Gelschüttler mit einer Verdünnung des jeweiligen Antikörpers (1:30,000 in PBS mit 3 % w/v BSA) inkubiert. Nach dreimaligem Waschen für jeweils 5 min mit PBS wurde die Membran mit dem sekundären Antikörper (Ziegen Anti-Kaninchen IgG konjugiert mit alkalischer Phosphatase, 1:20,000 in PBS mit 3 % w/v BSA) für 1.5 h bei RT inkubiert. Anschließend wurde die Membran drei mal für je 5 min mit PBS und einmal mit Alkalische-Phosphatase Puffer für 10 min bei RT gewaschen. Dann wurde die Membran in 20 ml Alkalische-

Phosphatase Puffer mit 132 µl NBT-Stammlösung und 66 µl BCIP-Stammlösung inkubiert und die Entwicklung durch Waschen in 20 ml Stopplösung zum Stillstand gebracht.

2.11.3 *In vitro* Co-Immunopräzipitation

Die Endkonzentrationen der verwendeten rekombinant gereinigten Enzyme (*E. coli* GluTR Wildtyp und A338Stop, *E. coli* GluRS, *E. coli* GSA-AM und *M. kandleri* GluTR R50Q) betrug jeweils 1 µM in Assay-Puffer. Substrate und Cofaktoren wurden in den folgenden Endkonzentrationen eingesetzt: *E. coli* tRNA-Pool (siehe 2.5.9.2, ca. 37 % tRNA^{Glu}) 20 µM, L-Glutamat 0.5 mM, ATP 4 mM, NADPH 2 mM und PLP 0.5 mM. Die Größe der Ansätze betrug 100 µl. Die Ansätze wurden entweder bei 4 °C für 10 min oder bei 37 °C für 2 min vorinkubiert, mit jeweils 300 µl Assay-Puffer verdünnt und mit je 1 µl des entsprechenden Serums für 30 min bei 4 °C unter Schütteln inkubiert. Anschließend wurde wie unter 2.12.2 beschrieben verfahren.

2.11.4 Lösungen zur Co-Immunopräzipitation

Aufschlußpuffer	Tris-HCl (pH 8.0)	50 mM
	NaCl	150 mM
	DTT	10 mM
	NP-40	0.5 % (v/v)
Waschpuffer	Tris-HCl (pH 8.0)	50 mM
	NaCl	150 mM
	EDTA	1 mM
	NP-40	0.1 % (v/v)
Assay-Puffer	HEPES (pH 8.0)	50 mM
	NaCl	150 mM
	MgCl ₂	10 mM
	DTT	5 mM
	Glycerin	10 % (v/v)
	BSA	0.1 % (w/v)
	Tween-20	0.05 % (v/v)

Western-Blotting

Towbin-Puffer	Tris (pH 8.3)	25 mM
	Glycin	192 mM
Ponceau S Stammlösung	Ponceau-S	2 % (w/v)
	TCA	30 % (w/v)
	5-Sulfosalicylsäure	30 % (w/v)
Blockierlösung	in PBS (siehe 2.5.9.2.1)	
	BSA	3 % (w/v)
	Triton X-100	0.1 % (w/v)
Waschlösung	PBS (siehe 2.5.9.2.1)	
AP-Puffer	Tris-HCl (pH 9.5)	100 mM
	NaCl	100 mM
	MgCl ₂	5 mM
NBT-Stammlösung	in 70 % (v/v) DMF	
	NBT	5 % (w/v)
BCIP-Stammlösung	in DMF	
	BCIP	5 % (w/v)
Stopplösung	in PBS (siehe 2.5.9.2.1)	
	EDTA	2 mM

2.12 Protein Cross-Linking

10 μ M *E. coli* GluTR in GluTR-Assay-Puffer wurde mit verschiedenen Konzentrationen von Glutardialdehyd (Endkonzentrationen 0.0001-0.01 % v/v) für 30 min bei RT inkubiert und anschließend je Ansatz (20 μ l) mit 10 μ l SDS-Probenpuffer versetzt, für 3 min bei 96 °C inkubiert und mittels SDS-PAGE analysiert.

3 Ergebnisse und Diskussion

Im ersten Teil der vorliegenden Arbeit sollte rekombinante *E. coli* GluTR gründlich biochemisch charakterisiert werden. So sollten dabei Parameter der Oligomerisation, der pH-Wert-Abhängigkeit der Katalyse, der Substratspezifität, sowie Details des Enzymmechanismus untersucht werden. Dazu war zunächst die Darstellung der Komponenten des C₅-Synthesewegs zur Bildung von ALA notwendig. Die *E. coli* tRNA^{Glu}, die *E. coli* GluRS und die *E. coli* GSA-AM wurden, wie im folgenden beschrieben, präpariert.

3.1 Herstellung von *Escherichia coli* tRNA^{Glu} durch *in vivo* Transkription und chromatographische Reinigung

Trotz des hohen Preises für die *E. coli* tRNA^{Glu} waren die verschiedenen von der Firma Sigma gelieferten Chargen immer von sehr unterschiedlicher Qualität (Glutamat spezifische Akzeptor-Aktivität: 450-1250 pmol/A₂₆₀). Die von Sigma angegebenen Glutamat spezifischen Akzeptor-Aktivitäten von 1750 pmol/A₂₆₀, entsprechend reiner tRNA^{Glu}, konnten in eigenen Experimenten nicht bestätigt werden (Tab. 4).

Aus diesen Gründen und, um dem großen Bedarf an *E. coli* tRNA^{Glu} in unserem Labor nachzukommen, wurde ein Protokoll zur Produktion, Reinigung und Anreicherung von tRNA^{Glu} etabliert.

Die Produktion der *E. coli* tRNA^{Glu} erfolgte durch konstitutive Transkription eines *E. coli* tRNA^{Glu} Gens, lokalisiert auf dem Vektor pKR15 im *E. coli* Stamm DH5α. Die Zellen wurden nach 20 h bei einer OD₅₇₈ von 4 geerntet. Zellaufschluß und Isolation der gesamten zellulären RNA erfolgten durch Extraktion mit sauer äquilibriertem Phenol. Der Rohextrakt enthielt hauptsächlich die überproduzierte tRNA^{Glu} zusammen mit den anderen zelleigenen tRNAs, rRNAs und mRNAs (Abb. 9, Bahn 3). Zur weiteren Reinigung und Anreicherung wurde der Rohextrakt an dem Anionenaustauschmaterial MonoQ chromatographisch aufgetrennt (Abb. 7).

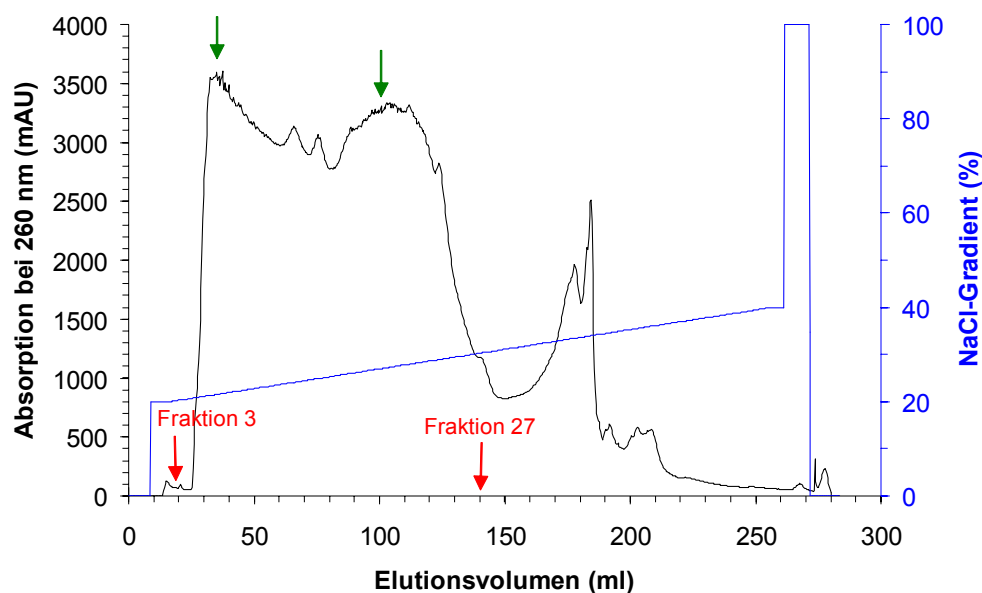


Abbildung 7: Chromatographische Reinigung und Anreicherung von *E. coli* tRNA^{Glu}. 25 mg RNA-Extrakt wurden an einer MonoQ HR10/10 durch Elution mit einem Gradienten von 0-2 M NaCl aufgetrennt. Der Bereich zwischen Fraktion 3 und 27 enthielt tRNA^{Glu}. Maximale Glutamat-Akzeptor-Aktivität wurde in den Fraktionen 6 und 19 gefunden (grüne Pfeile und Abb. 8). Details der Trennung sind unter 2.5.9.3 (Material und Methoden) angegeben.

Vorversuche ergaben, dass das Eluat nach 150 ml keine Glutamat spezifische Akzeptor-Aktivität mehr aufwies. Deshalb wurden nur die zwischen den Fraktionen 3 und 27 eluierten Nukleinsäuren auf tRNA^{Glu} untersucht. Hierbei zeigten sich zwei Maxima mit tRNA^{Glu} Akzeptor-Aktivität in den Fraktionen 6 und 19 (Abb. 8). Diese hatten ungefähr die gleiche spezifische Aktivität von 1100 pmol/A₂₆₀-Einheit (Tab. 4) und die Analyse mittels 8 M Harnstoff/PAGE zeigte, dass die in den Fraktionen enthaltenen Spezies die gleiche relative molekulare Masse aufwiesen. Die relative Fläche des zweiten Maximums nahm bei RNA-Extrakten aus Zellkulturen in der stationären Phase im Vergleich mit RNA-Extrakten aus Zellkulturen in der logarithmischen Phase zu. Deshalb wurde vermutet, dass die Unterschiede im chromatographischen Verhalten auf Variationen der posttranskriptionalen Basenmodifikation zurückzuführen sind (Borel *et al.*, 1993; Madore *et al.*, 1999).

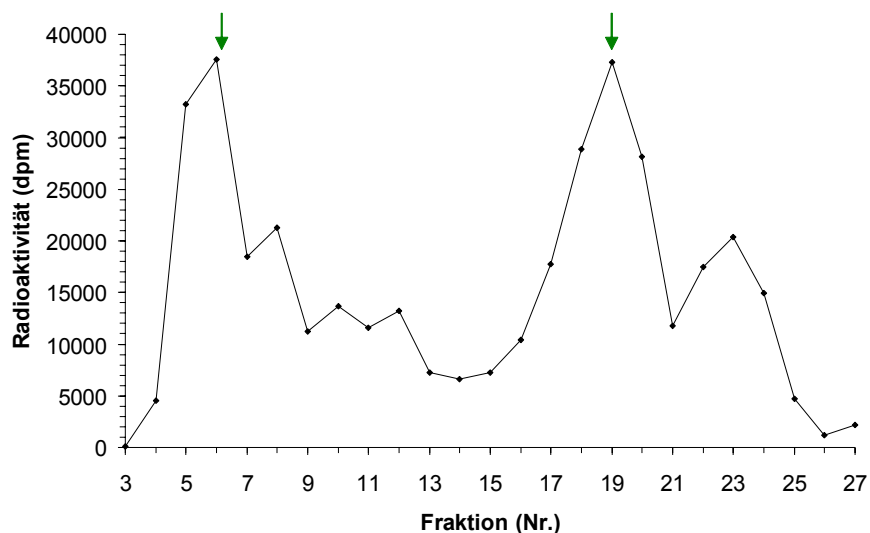


Abbildung 8: Beladung mit $[^{14}\text{C}]\text{Glu}$ der tRNA in den Fraktionen des durch Anionenaustauschchromatographie an MonoQ fraktionierten RNA-Extrakts. Der rohe RNA-Extrakt wurde in zwei Maxima (grüne Pfeile) mit der gleichen Glutamat spezifischen Akzeptor-Aktivität getrennt. Analysiert wurden die Fraktionen 3 bis 27 der chromatographischen Trennung (Abb. 7). Die Glutamat-Akzeptor-Aktivität wurde durch Aminoacylierung mit *E. coli* GluRS und $[^{14}\text{C}]\text{Glu}$ bestimmt.

Die erreichte Reinheit der tRNA^{Glu}-Präparation war für Depletionstests mit der GluTR ausreichend und übertraf die der von Sigma gelieferten RNA. Aus 3 l Zellkultur konnten so 9 mg *E. coli* tRNA^{Glu} gewonnen werden (Tab. 4, Abb. 9).

Tabelle 4: Reinigung und Anreicherung von *E. coli* tRNA^{Glu} aus *E. coli* DH5α/pKR15^a

Reinigungsstufe	Gesamt RNA (mg)	Glutamat spezifische Akzeptor Aktivität (pmol/A ₂₆₀)	Ausbeute (%)	Reinheit (%)
Sigma tRNA ^{Glu}	-	350-1250	-	20-71
Rohextrakt	25	650	100	37
MonoQ Fraktion 6	5	1150	20	66
MonoQ Fraktion 19	4	1100	16	63

^a Ausgehend von 7 g Naßzellen. Die Akzeptor-Aktivität wurde durch die Bildung von $[^{14}\text{C}]\text{Glu-tRNA}$ mittels Aminoacylierung durch rekombinante *E. coli* GluRS und $[^{14}\text{C}]\text{Glu}$ gemessen. Die Reinheit wurde aus dem Vergleich der gemessenen Akzeptor-Aktivitäten der jeweiligen Fraktion mit der theoretischen maximalen Aktivität für reine tRNA^{Glu} abgeleitet. Diese maximale Aktivität wurde unter Verwendung einer M_r von 24,400 für tRNA^{Glu} und einer A₂₆₀ von 1 für 40 µg tRNA berechnet.

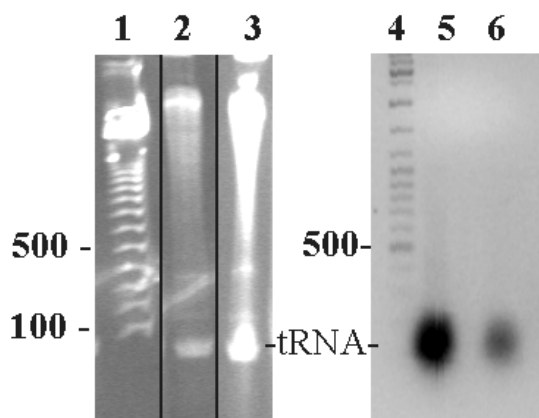


Abbildung 9: Produktion und Reinigung von *E. coli* tRNA^{Glu}. Bahn 1-3 zeigt eine 8 M Harnstoff/0.1 % SDS-20 % PAGE, Bahn 4-6 ein 2 % Agarose-Gel. Die Detektion der RNA erfolgte durch Ethidiumbromid-Färbung. Bahn 1 und 4 zeigen den Längenstandard Generuler DNA Laddermix (bp). Die Gele wurden beladen mit: Bahn 2, roher RNA-Extrakt der Zellkultur bei OD₅₇₈ = 0.6. Bahn 3, roher RNA-Extrakt der Zellkultur bei OD₅₇₈ = 4. Bahn 5, 5 µg gereinigte tRNA, Fraktion 6 der MonoQ. Bahn 6, 2 µg Sigma tRNA^{Glu}.

3.2 Rekombinante Produktion und chromatographische Reinigung der *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Synthetase

Um die Aktivität gereinigter, rekombinanter *E. coli* GluTR zu bestimmen, wurde das Substrat Glutamyl-tRNA benötigt. Für die enzymatische Darstellung des Substrats war es erforderlich die *E. coli* GluRS rekombinant herzustellen und zu reinigen. Die Überproduktion des Enzyms erfolgte mit dem Plasmid pLQ7612 (Brisson *et al.*, 1989) im *E. coli* Stamm DH10β. Bei dem verwendeten Expressionsvektor pLQ7612 mit dem die *E. coli* GluRS kodierenden *gltX*-Gen, handelt es sich um ein thermoinduzierbares „conditional runaway-replication“-System. Bei Temperaturen unter 37 °C liegt das Plasmid pro Zelle nur einmal vor. Durch Temperaturerhöhung über 37 °C steigt die Kopienzahl des Vektors auf ca. 1000 Stück je Zelle an (Larsen *et al.*, 1984). Während der exponentiellen Zunahme der Plasmid-DNA erfolgt auch die verstärkte Produktion der plasmidcodierten Genprodukte ohne zusätzliche transkriptionale Induktion. Die Induktion führte zur Bildung eines einzigen zusätzlichen Proteins in der SDS-PAGE Analytik. Die beobachtete M_r von etwa 55,000 dieses Proteins stimmt mit dem berechneten Molekulargewicht für die *E. coli* GluRS von 54,285 Da überein.

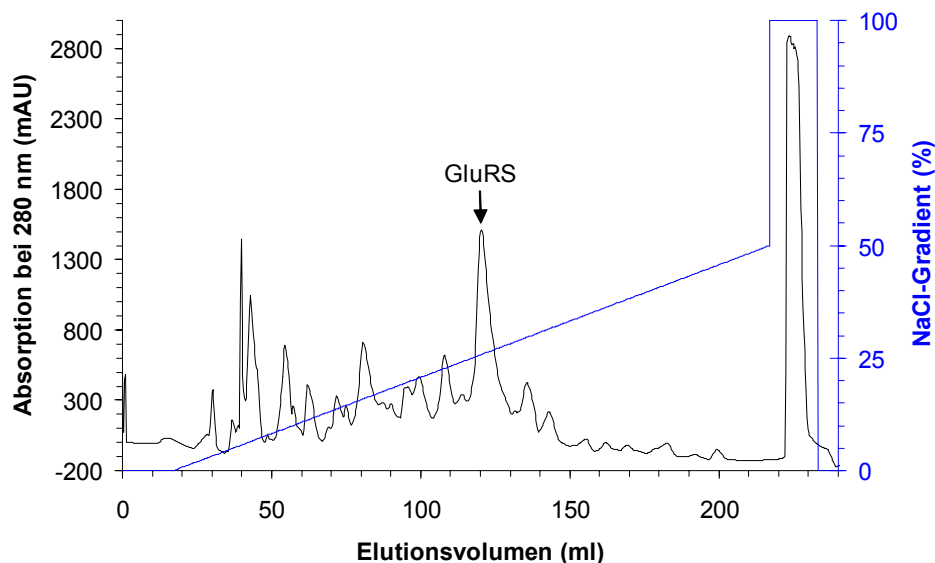


Abbildung 10: Reinigung rekombinanter *E. coli* GluRS mittels Anionenaustauschchromatographie an MonoQ. Chromatographische Trennung der Dextran-Phase nach der Zweiphasensystem-Reinigung auf MonoQ. Die Trennung der gebundenen Proteine erfolgte durch Elution mit einem NaCl-Gradienten von 0-1 M. Die GluRS eluierte spezifisch bei einer Salzkonzentration von 250 mM. Details der Trennung sind unter 2.6.1.4 (Material und Methoden) angegeben.

Die Präparation erfolgte wie bei Lin *et al.*, 1992 beschrieben. Nach dem Zellaufschluß mittels Ultraschall und anschließender Zentrifugation befand sich die GluRS mit anderen löslichen Zellbestandteilen im Überstand. Im ersten Reinigungsschritt erfolgte die Verteilung des zellfreien Extraktes in einem Polyethylenglykol/Dextran Zweiphasen-System. Dabei wurde ein großer Teil der Wirtsproteine und der Nucleinsäuren von der GluRS getrennt, die sich mit einigen anderen Proteinen in der oberen Phase befand. Diese verdünnte obere Dextran-Phase wurde nun im zweiten Reinigungsschritt über eine Anionenaustauschchromatographie an MonoQ weiter gereinigt. Die GluRS eluierte spezifisch bei einer Salzkonzentration von 250 mM NaCl (Abb. 10). Da die GluRS nach diesem Reinigungsschritt noch mit einigen anderen Proteinen verunreinigt war (Abb. 11, Bahn 2 und 3), wurde anschließend eine GPC an Superdex 200 vorgenommen, um apparent homogenes Enzym zu erhalten (Abb. 11, Bahn 4).

Nach der GPC wurde die GluRS durch Ultrafiltration auf 25 mg/ml konzentriert und nach Zusatz von Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 50 % (v/v) bei -25°C gelagert. Unter diesen Bedingungen konnte das Enzym bis zu zwei Jahren ohne Aktivitätsverlust aufbewahrt werden. Auf diese Weise wurde aus einem Liter Zellkultur 12 mg native GluRS gewonnen.

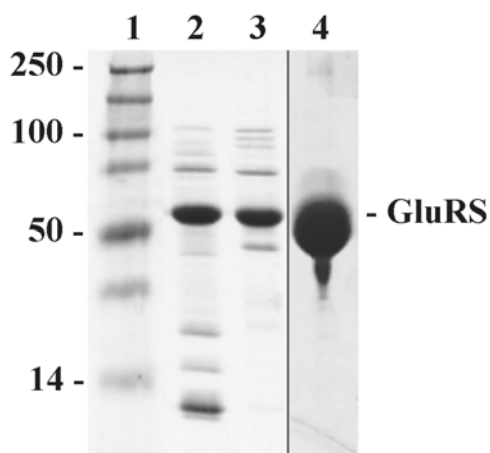


Abbildung 11: Reinigung rekombinanter *E. coli* GluRS. Proteine wurden mittels 0.1 % SDS-13 % PAGE getrennt und mit Coomassie Brilliant Blau visualisiert. Bahn 1 zeigt den Molekulargewichtsstandard, die relative molekulare Masse ($\times 10^3$) ist angegeben. Getrennt wurden: Bahn 2 und 3, GluRS enthaltende Fraktionen nach Anionenaustauschchromatographie an MonoQ. Bahn 4, GluRS nach Gelpermeationschromatographie an Superdex 200 und Konzentrierung.

3.3 Rekombinante Produktion und Reinigung der *Escherichia coli* Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase

Die Überexpression des *E. coli hemL* Gens wurde unter Verwendung des Expressionsplasmids pLIpopC im *E. coli* Stamm BL21(λ DE3), der chromosomal das Gen für die T7 RNA-Polymerase enthält, durchgeführt. Der verwendete Vektor pLIpopC ist ein pET3-Derivat, in dem das Zielgen unter Kontrolle eines IPTG induzierbaren T7-Promotors steht (Studier *et al.*, 1990; Ilag *et al.*, 1991) und den Wirtszellen Ampicillinresistenz verleiht. Die Zellen wurden 3 h nach der Induktion bei einer OD_{578} von 2.5 geerntet. Die rekombinante GSA-AM machte zu diesem Zeitpunkt bereits den größten Teil der gesamten zellulären Proteine aus (Abb. 12, Bahn 4). Die beobachtete M_r von etwa 45,000 für die rekombinante *E. coli* GSA-AM stimmt mit dem berechneten Molekulargewicht von 45,365 Da überein. Nach dem Zellaufschluß mittels Ultraschall lag das Enzym als lösliches Protein im zellfreien Extrakt vor.

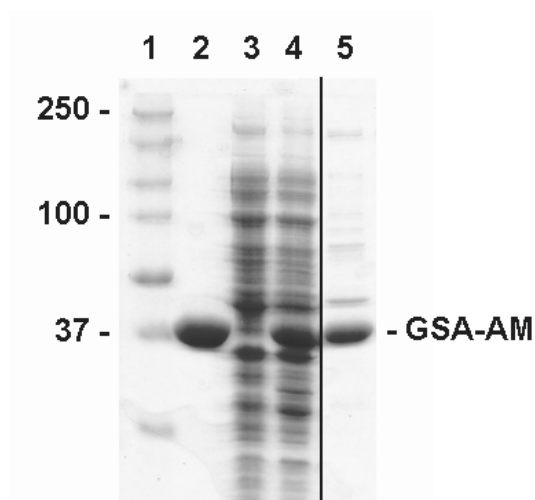


Abbildung 12: Reinigung rekombinanter *E. coli* GSA-AM. Proteine wurden mittels 0.1 % SDS-12 % PAGE getrennt und mit Coomassie Brilliant Blau visualisiert. Bahn 1 zeigt den Molekulargewichtsstandard, die relative molekulare Masse ($\times 10^3$) ist angegeben. Getrennt wurden: Bahn 2, homogene GSA-AM nach Gelpermeationschromatographie und Konzentrierung. Bahn 3, *E. coli* BL21(λ DE3)/pLIpopC vor der Induktion. Bahn 4, *E. coli* BL21(λ DE3)/pLIpopC nach der Induktion mit 0.4 mM IPTG für 3 h. Bahn 5, GSA-AM nach Anionenaustauschchromatographie an MonoQ.

Zur Reinigung des überproduzierten Proteins wurde eine Chromatographie des zellfreien Extrakts an dem Anionenaustauscher MonoQ vorgenommen. Die GSA-AM eluierte spezifisch bei einer Salzkonzentration von 450 mM KCl (Abb. 13).

Nach diesem ersten Reinigungsschritt war das Enzym noch mit Wirtsproteinen verunreinigt (Abb. 12, Bahn 5). Deshalb wurde anschließend eine Gelfiltration an Superdex 200 durchgeführt (Abb. 14). Hierdurch wurde apparent homogene GSA-AM erhalten (Abb. 12, Bahn 2). Die GSA-AM enthaltenden Fraktionen wurden vereinigt und durch Ultrafiltration auf 11 mg/ml konzentriert. Nach dem Zusatz von Glycerin bis zu einer Endkonzentration von 50 % (v/v) wurde die GSA-AM bei $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ gelagert. Die Ausbeute betrug 45 mg an homogener GSA-AM aus 2.5 l Zellkultur.

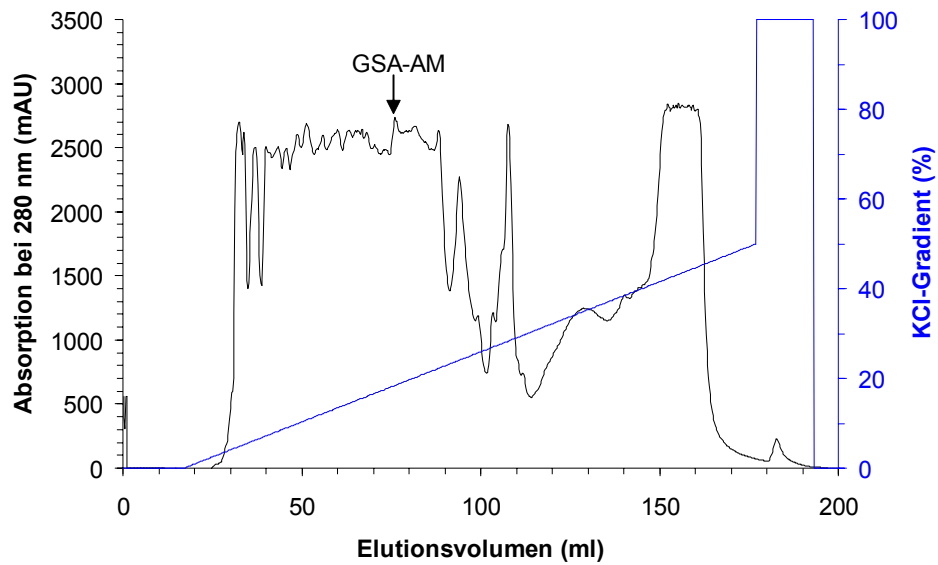


Abbildung 13: Reinigung rekombinanter *E. coli* GSA-AM mittels Anionenaustauschchromatographie an MonoQ. Chromatographische Trennung des zellfreien Extrakts an MonoQ. Die Trennung der Proteine erfolgte durch Elution mit einem Gradienten von 0-2 M KCl. Die GSA-AM eluierte spezifisch bei einer Salzkonzentration von 450 mM KCl. Details der Trennung sind unter 2.6.2.3 (Material und Methoden) angegeben.

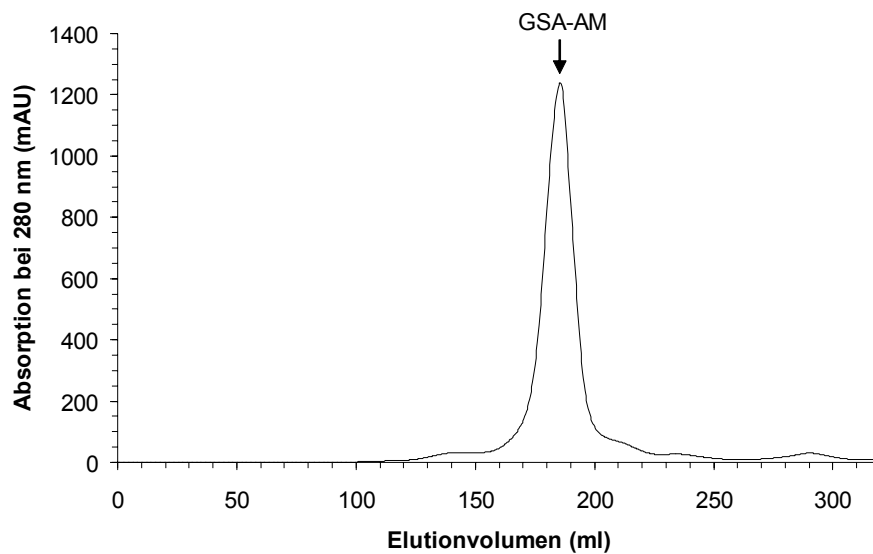


Abbildung 14: Elutionsdiagramm der präparativen Gelpermeationschromatographie der *E. coli* GSA-AM durch Superdex 200. Das Enzym eluierte als symmetrischer Peak. Details der Chromatographie sind unter 2.6.2.4 (Material und Methoden) angegeben.

3.4 Produktion, Renaturierung und Reinigung der Glutamyl-tRNA Reduktase aus *Escherichia coli*

Die Überexpression des *E. coli hemA* Gens wurde unter Verwendung des Expressionsplasmids pBKCwt im *E. coli* Stamm BL21(λ DE3), der chromosomal das Gen für die T7 RNA-Polymerase enthält, durchgeführt. Das hierbei produzierte Fusionsprotein enthält einen N-terminalen His(6)-Tag, der eine affinitätschromatographische Reinigung ermöglichte und durch spezifischen Verdau mit der Protease Thrombin abgespalten werden konnte. Zwei Stunden nach der Induktion stellten die Zellen bei einer OD_{578nm} von 2.5 ihr Wachstum ein und wurden geerntet. Die rekombinante GluTR machte zu diesem Zeitpunkt den größten Teil der gesamten zellulären Proteine aus (Abb. 15, Bahn 3).

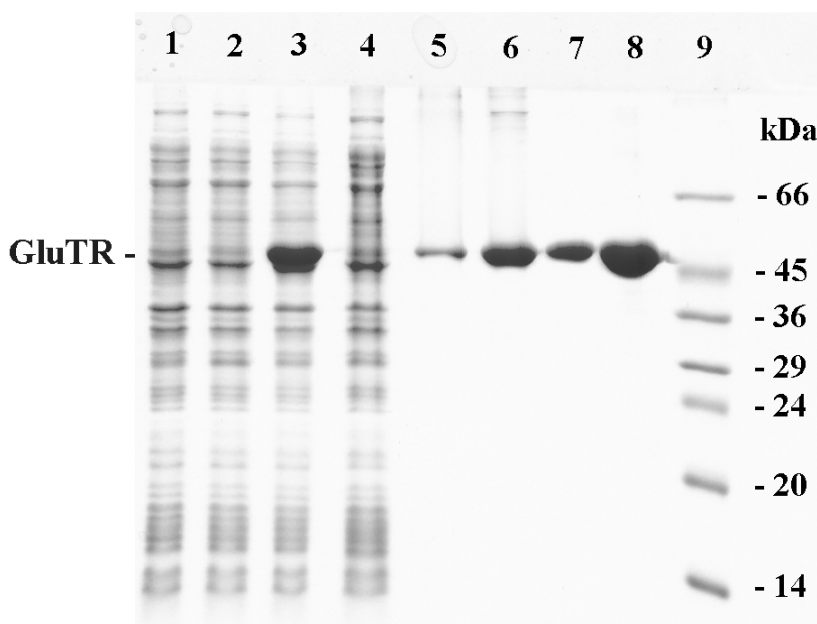


Abbildung 15: Reinigung rekombinanter *E. coli* GluTR. Proteine wurden mittels 0.1 % SDS-13.5 % PAGE getrennt und mit Coomassie Brilliant Blau visualisiert. Getrennt wurden: Bahn 1, *E. coli* BL21(λ DE3) mit pET-15b Vektor ohne Insert als Negativkontrolle. Bahn 2, *E. coli* BL21(λ DE3)/pBKCwt vor der Induktion. Bahn 3, *E. coli* BL21(λ DE3)/pBKCwt nach der Induktion mit 0.25 mM IPTG für 2 h. Bahn 4, Überstand des Zelllysates. Bahn 5, Sediment des Zelllysats. Bahn 6, GluTR nach Affinitätschromatographie an Ni-IDA (IMAC). Bahn 7, homogene GluTR nach Gelpermeationschromatographie an Superdex 200. Bahn 8, GluTR nach Konzentrierung. Bahn 9, Proteinstandard, Dalton Mark VII.

Die Überproduktion der GluTR führte zu intrazellulärer Aggregatbildung, so daß nahezu das gesamte rekombinante Protein in Form von unlöslichen Einschlusskörpern (Inclusion Bodies) vorlag (Abb. 15, Bahn 5) und Spuren löslicher GluTR nur durch Western-Blotting des Überstandes des zellfreien Extraktes nachweisbar waren.

Versuche durch Variation der Temperatur vor und nach der Induktion, des Zeitpunktes der Induktion, der zeitlichen Länge der Induktion, der Konzentration des Induktors oder durch die Zugabe von Ethanol zum Medium den Anteil an löslichem Protein zu erhöhen, führten nicht zum gewünschten Erfolg und bestätigten die Erfahrungen anderer Experimentatoren bei der rekombinanten Produktion von *E. coli* GluTR (Jahn *et al.*, 1991; Verkamp *et al.*, 1992; Chen *et al.*, 1996). Die Trennung der Inclusion Bodies von Zelltrümmern und Membranfragmenten nach dem Zellaufschluß erfolgte durch Waschen des Zell-Sedimentes mit einem schwach denaturierenden Puffer in Anwesenheit von Detergenz. Nach dem Solubilisieren und der Bindung des Proteins an das mit Ni^{2+} -beladene Affinitätsmaterial Chelating Sepharose Fast Flow (Ni-IDA) erfolgte die Faltung der Polypeptidketten durch einen Pufferwechsel von denaturierenden zu nativen Bedingungen. Hierzu diente ein linearer Gradient von 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 6 M Harnstoff, 0.5 M NaCl und 5 mM β -Mercaptoethanol zu 20 mM Tris-HCl (pH 8.0), 20 % (v/v) Glycerin, 0.5 M NaCl und 5 mM β -Mercaptoethanol über 30 Säulenvolumen (1200 ml) und 20 h bei Raumtemperatur.

3.4.1 Trennung von Glutamyl-tRNA Reduktase Dimeren und unspezifischen Proteinaggregaten durch Gelpermeationschromatographie

Nach der Rückfaltung wurde die GluTR durch eine Imidazolstufe von der Ni-IDA Säule eluiert. Das Eluat bestand aus einer Mischung von nativer GluTR und aggregierten Faltungszwischenprodukten, die durch GPC voneinander getrennt wurden (Abb. 16).

Nach der präparativen GPC wurden die Fraktionen, die die native GluTR enthielten durch Ultrafiltration bis zu einer Konzentration von 15 mg/ml angereichert. Ab Proteinkonzentrationen von 20 mg/ml präzipitierte das Enzym irreversibel innerhalb weniger Minuten in den Konzentratoren. Das beschriebene Verfahren führt zu apparent homogener GluTR mit einer Reinheit von $> 97\%$ (Abb. 15, Bahn 8). Auf diese Weise konnten aus einem Liter Zellkultur 9 mg native GluTR gewonnen werden (Tab. 5). Die Faltungsausbeute liegt bei ca. 10 % bezogen auf das Trockengewicht der eingesetzten Inclusion Bodies.

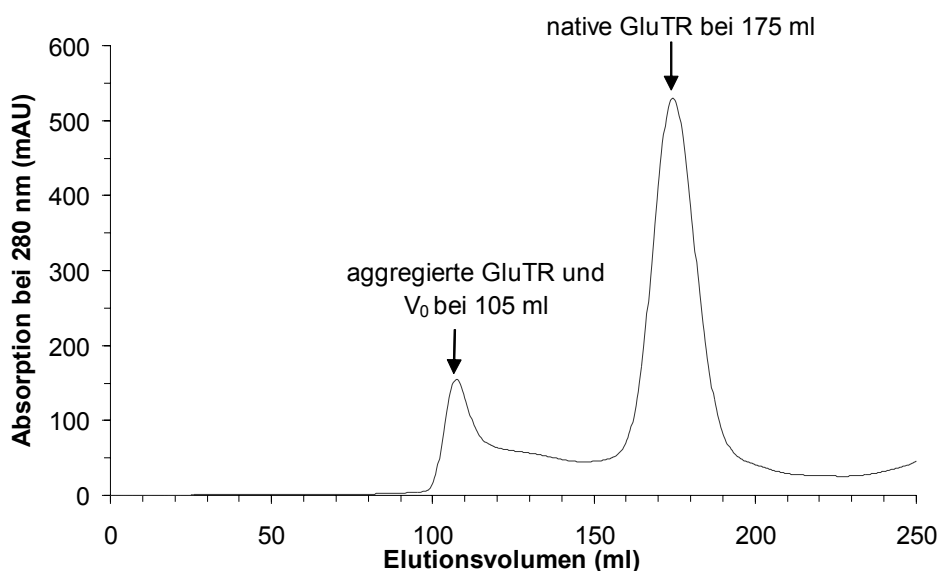


Abbildung 16: Trennung von nativer und aggregierter GluTR des Ni-IDA Eluates durch Gelpermeationschromatographie an Superdex 200. Das aggregierte Protein eluierte bei 105 ml, entsprechend dem Ausschlussvolumen der Säule und einer relativen molekularen Masse größer als 600,000. Das native Protein eluierte als symmetrischer Peak bei 175 ml. Details der Chromatographie sind unter 2.7.3.4 (Material und Methoden) angegeben.

Um die Ausbeute an korrekt gefaltetem Protein zu erhöhen wurden während der Rückfaltung verschiedene Additive zugesetzt (De Bernandez Clark *et al.*, 1999). Es wurde jedoch beobachtet, dass der Zusatz von nichtdenaturierenden Konzentrationen an Harnstoff (0.5–2 M), Polyethylen-glykol (0.2 g/l), CHAPS (5–20 mM) oder Triton X-100 (5–10 mM) zum Renaturierungspuffer zu vermehrter Aggregatbildung führte. Lediglich der Zusatz von Glycerin (10–40 %, v/v) führte zu einer höheren Ausbeute an nativen Enzym. Bei Glycerinkonzentrationen über 20 % (v/v) blieben die Faltungsausbeuten konstant, so dass standardmäßig ein Glyceringehalt von 20 % (v/v) im Renaturierungspuffer verwendet wurde. Ein weiterer wichtiger Parameter, der den Faltungsprozess beeinflusste, war die Zeit. Faltungsgradienten über 30 V_t (1200 ml) über 2 h führten ausschließlich zur Bildung von Aggregaten. Die zeitliche Verlängerung des Gradienten auf 20 h unter sonst identischen Bedingungen, resultierte in der Bildung von nativem Enzym. Wurde die gereinigte GluTR in dem oben beschriebenen Puffer unter Zusatz von 0.5 mM CHAPS bei –80 °C gelagert, so war nach 9 Monaten noch kein Aktivitätsverlust feststellbar.

Tabelle 5: Reinigung von *E. coli* His(6)-GluTR aus *E. coli* BL21(DE3)/pBKCwt^a

Reinigungsstufe	Gesamtprotein (mg)	Protein-ausbeute (%)	Gesamtaktivität (U)	Spezifische Aktivität (U ^b /mg)	Ausbeute (%)	Anreicherung (x)
Zellextrakt	397	100	n.m. ^c	n.m.	n.m.	n.m.
Inclusion Bodies	184	46	n.m.	n.m.	n.m.	n.m.
Ni-IDA ^d	23	6	8.51	0.37	100	1
Superdex 200	18	5	8.46	0.47	99	1.3

^a Ausgehend von 3.2 g Naßzellen

^b Ein Unit ist definiert als die Umsetzung von 1 µmol glutamyl-tRNA^{Glu}/min zu GSA

^c Nicht meßbar

^d Nickel-iminodiacetic acid-Sepharose

3.5 Charakterisierung der *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase

3.5.1 N-terminale Aminosäuresequenzbestimmung und Massenspektrometrie

Die N-terminale Aminosäuresequenzbestimmung der rekombinanten GluTR nach proteolytischer Abspaltung des His(6)-Tags wurde mittels Edman-Abbau durchgeführt und ergab folgende Aminosäuresequenz: GSHMLEDPMTLLALGINHKTAPV. Diese Sequenz ist mit der aus der Gensequenz abgeleiteten Aminosäuresequenz identisch. Sie enthält acht zusätzliche N-terminale Aminosäuren die sich aus der Expression von *hemA* als Fusionsprotein mit dem His(6)-Tag ergeben und hinter der Thrombin-Spaltungsstelle liegen. Die Identität des produzierten Proteins wurde weiterhin durch ein Massenspektrum (MALDI-MS) der Peptidfragmente des trypsinverdauten Enzyms und dem Datenbankvergleich des Fragmentmusters bestätigt.

Das berechnete Molekulargewicht einer Untereinheit wurde durch Massenspektrometrie verifiziert. Hierzu wurde ein Massenspektrum (ESI-MS) aufgenommen. Das gefundene Molekulargewicht von $48,448 \pm 30$ Da stimmte mit dem errechneten theoretischen Molekulargewicht von 48,475 Da überein. Die erhaltenen Daten zeigen eindeutig, dass nach der Proteinreinigung intaktes GluTR-Enzym erhalten wurde.

3.5.2 Native molekulare Masse

Die analytische Gelpermeationschromatographie wurde, wie im Methodenteil beschrieben, unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt. Wurde die GluTR in Anwesenheit von Reduktionsmitteln gereinigt und analysiert, so eluierte diese spezifisch als symmetrischer Peak bei einem Elutionsvolumen von 12.75 ml. Durch Vergleich mit dem Eichlauf wurde eine relative molekulare Masse für die GluTR von $180,000 \pm 10,000$ bestimmt (Abb. 17).

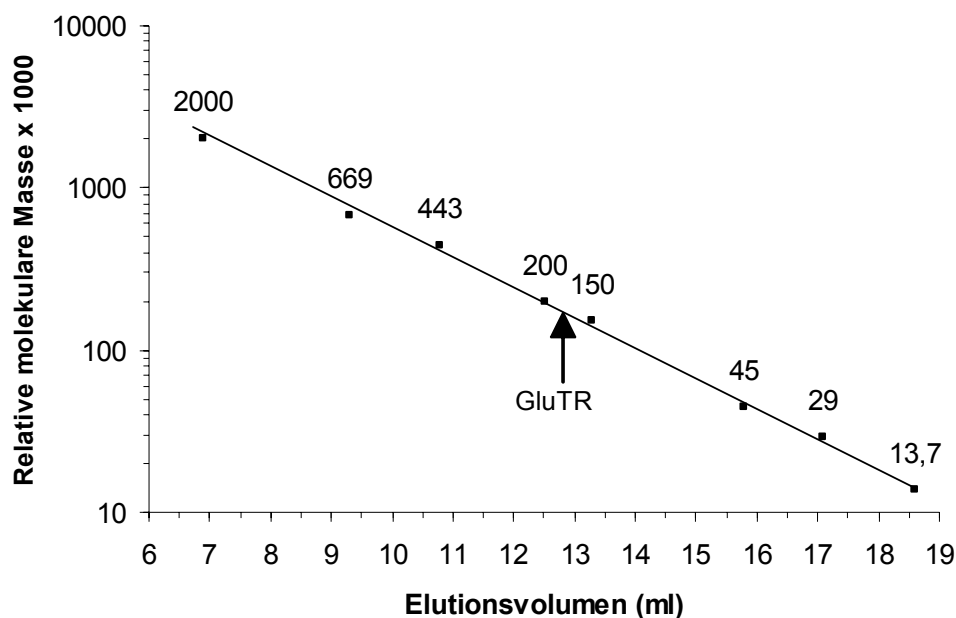


Abbildung 17: Bestimmung der relativen molekularen Masse der *E. coli* GluTR mittels GPC. Die GPC wurde wie unter 2.7.3 (Material und Methoden) beschrieben durchgeführt. Folgende Molekulargewichts-Standards wurden verwendet: Blue Dextran 2,000,000; Thyroglobulin 669,000; Apoferritin 443,000; β -Amylase 200,000; Alkoholdehydrogenase 150,000; Ovalbumin 45,000; Carboanhydrase 29,000 und Ribonuklease A 13,700. Aufgetragen wurden die Elutionsvolumina der einzelnen Markerproteine gegen den Logarithmus ihrer M_r . Aus dem Elutionvolumen für die *E. coli* GluTR wurde so eine M_r von $180,000 \pm 10,000$ abgeleitet.

Durch Auftragung der bekannten Stokes Radii der Markersubstanzen gegen $-(\log K_{AV})^{1/2}$ wurde unter Annahme einer globulären Struktur für die GluTR ein apparenter Stokes Radius von ca. 48 Å abgeleitet (Siegel & Monty, 1966). Dieses Ergebnis stimmt mit dem für die *M. kandleri* GluTR bestimmten apparenten Stokes Radius und der ursprünglichen Schlußfolgerung daraus, dass die GluTR als Homotetramer vorliegt, überein (Moser *et al.*, 1999).

Im Verlauf dieser Arbeit wurde die Kristallstruktur der GluTR aus *M. kandleri* gelöst (Moser *et al.*, 2001). Hierbei zeigte sich, dass der bis dahin durch biophysikalische Untersuchungen vermutete homotetramere Oligomerisierungsgrad des Enzyms nicht vorlag. Vielmehr stellt die *M. kandleri* GluTR ein ausladendes, V-förmiges Homodimer mit einem Stokes Radius von ca. 80 Å dar. Da die GluTR also nicht als globuläres Protein vorliegt, entspricht die durch GPC ermittelte native molekulare Masse einem Proteindimer. Zusammen mit 35 % Identität auf Aminosäureebene zwischen *E. coli* und *M. kandleri* GluTR liegt die Vermutung nahe, dass auch das *E. coli* Enzym ein nicht kugelförmiges Homodimer ist.

Um diese Annahme mit einer Proteinform-unabhängigen Methode zu verifizieren wurden Cross-Linking Experimente mit Glutardialdehyd und anschließender SDS-PAGE durchgeführt. Die Zugabe steigender Konzentrationen des bifunktionellen Vernetzungsmittels führte zur Bildung von GluTR mit einer M_r von ca. 95,000 (Abb. 18).

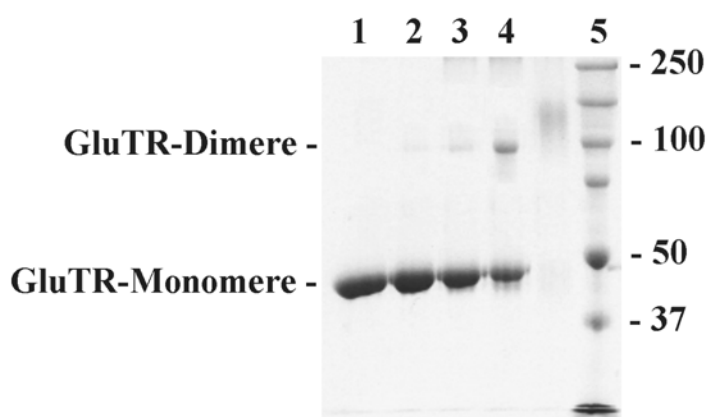


Abbildung 18: Cross-Linking von *E. coli* GluTR mit Glutardialdehyd und anschließender SDS-PAGE. Jeweils 400 µg Protein wurden mit steigenden Konzentrationen an Aldehyd wie unter 2.12 beschrieben inkubiert. Gezeigt ist: Bahn 1, ohne Aldehyd. Bahn 2, 0.0001 %. Bahn 3, 0.0005 %. Bahn 4, 0.001 %. Bahn 5, Molekulargewichtsstandard, die relative molekulare Masse ($\times 10^3$) ist angegeben.

Unter Berücksichtigung der berechneten molekularen Masse von 48,475 Da je Untereinheit und den Ergebnissen der Massenspektrometrie wurde gefolgert, dass die native *E. coli* GluTR als homodimeres Protein vorliegt.

3.5.3 Aggregationsverhalten der nativen GluTR

Im Laufe der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass das präparierte Enzym durch die Aufbewahrung bei 4 °C für 10 Tage nahezu seine gesamte Aktivität verliert und dabei teilweise ausfällt. Durch die Untersuchung der verbliebenen Überstände mittels GPC konnte gezeigt werden, dass eine erneute Aggregatbildung stattgefunden hatte und nur noch ein geringer Prozentsatz der GluTR-Präparation dimerisiert vorlag (Abb. 19).

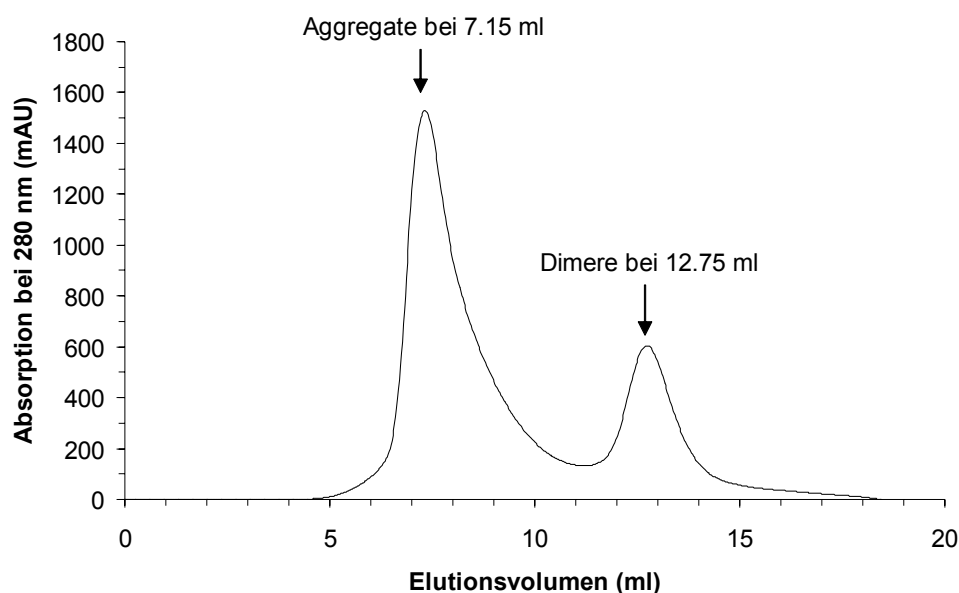


Abbildung 19: Elutionsdiagramm der analytischen Gelpermeationschromatographie unter reduzierenden Bedingungen. 400 µg rekombinante *E. coli* GluTR wurde 10 Tage nach der Präparation und Aufbewahrung bei 4 °C mittels GPC analysiert. Der größte Teil der Proteinpräparation war nach dieser Zeit aggregiert und eluierte bei ca. 7 ml, entsprechend dem Ausschlussvolumen der Säule und einer relativen molekularen Masse größer als 600,000. Details der Chromatographie sind unter 2.7.3 (Material und Methoden) angegeben.

Die Zusammensetzung der Aggregate war sehr heterogen. Sie eluierten in der Gelfiltration unter reduzierenden Bedingungen als breiter, unsymmetrischer Peak bei einem Elutionsvolumen im Bereich von ca. 7-11 ml, entsprechend relativen Molekulargewichten von 250,000 – 1,200,000. Da die Versuche unter reduzierenden Bedingungen durchgeführt wurden, konnte eine unspezifische Aggregation über oxidationsempfindliche, oberflächenlokalisierte Cysteine durch Disulfidbrückenbildung ausgeschlossen werden. Dies bestätigte auch das analoge chromatographische Verhalten der *E. coli* GluTR-Mutante C50/74/170S, in der alle 3 vorhandenen Cysteine gegen Serin ausgetauscht waren.

Auch die Analyse der aggregathaltigen Proteinlösung im Vergleich mit einer aggregatfreien GluTR-Lösung mittels SDS-PAGE zeigte die Bildung hochmolekularer Aggregate unterschiedlicher Molekulargewichte an (Abb. 20).

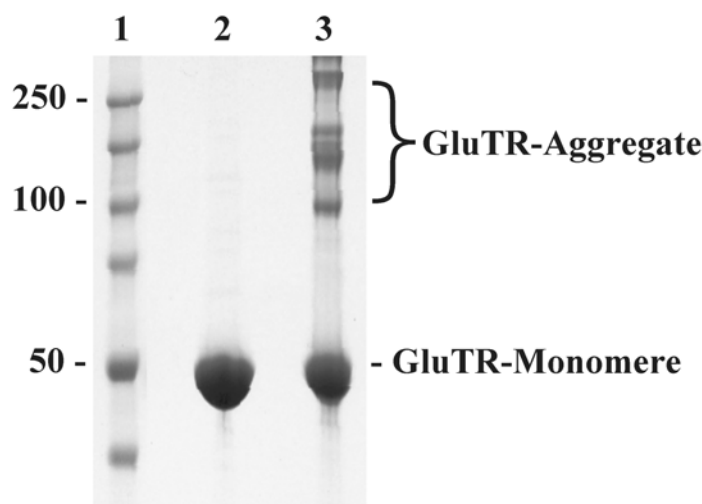


Abbildung 20: SDS-PAGE von aggregierten und nativen Proteinlösungen. Proteine wurden mittels 0.1 % SDS-12 % PAGE getrennt und mit Coomassie Brilliant Blau visualisiert. Getrennt wurden: Bahn 1, Molekulargewichtsstandard, die relative molekulare Masse ($\times 10^3$) ist angegeben. Bahn 2, 400 μ g native, frisch präparierte GluTR. Bahn 3, 400 μ g GluTR, nach 10 Tagen bei 4 °C.

Eine Alignment-basierende Strukturvorhersage für die *E. coli* GluTR aus den Strukturdaten der *M. kandleri* GluTR ermöglichte einen Oberflächenvergleich beider Enzyme. Hierbei unterscheidet sich das *E. coli* Enzym durch großflächige Bereiche, die mit unpolaren Aminosäuren (gelb und grün dargestellt in Abb. 21) besetzt sind, von der GluTR aus *M. kandleri*.

Diese Ergebnisse deuten darauf hin, dass intermolekulare hydrophobe Wechselwirkungen zur Agglomeration von GluTR-Dimeren zu Aggregaten steigenden Molekulargewichts und schließlich zur Präzipitation des Proteins führen. Es konnte gezeigt werden, dass durch den Zusatz von CHAPS zum Lösungsmittel die Aggregatbildung deutlich verlangsamt werden kann. Nur durch die Aufbewahrung des Proteins bei -80 °C konnte die Aggregationsgeschwindigkeit so weit herabgesetzt werden, so daß auch nach neun Monaten keine Aggregatbildung oder ein Aktivitätsverlust feststellbar waren.

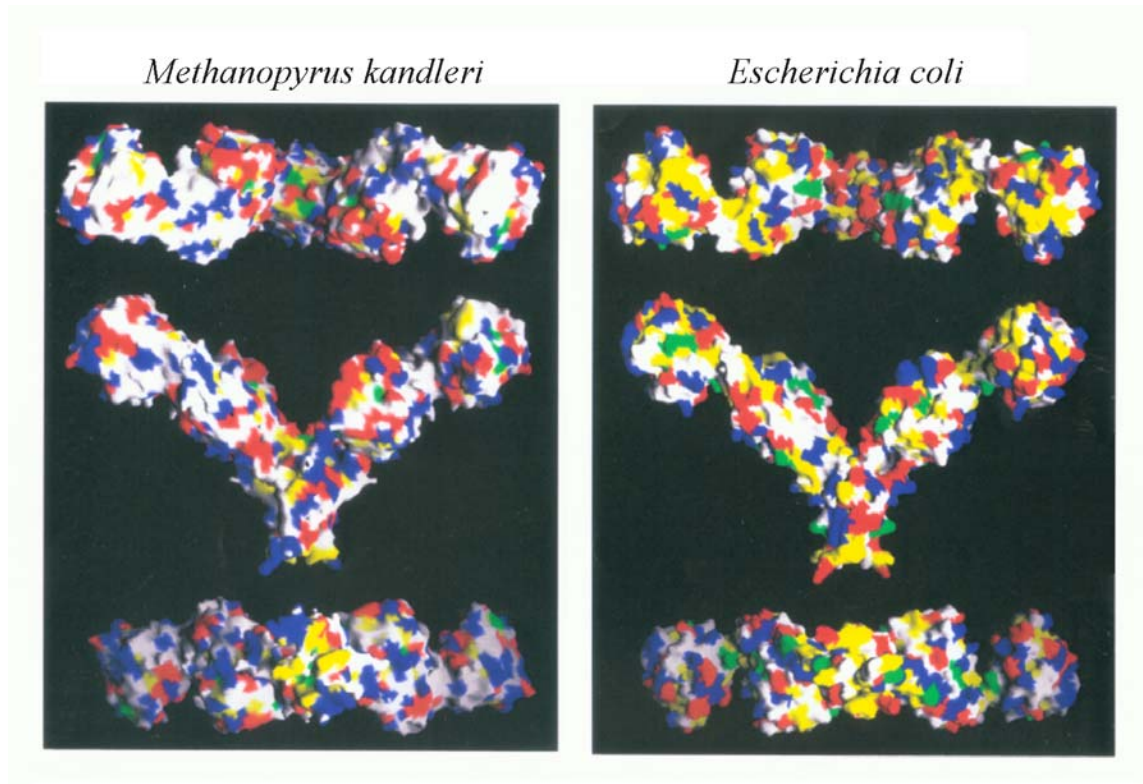


Abbildung 21: Oberflächenvergleich von *M. kandleri* und *E. coli* GluTR. Die Abbildung zeigt Ansichten der homodimeren Enzyme von oben, von der Seite und von unten, entlang der zweizähligen Symmetrieachse. Die Farbkodierung entspricht folgenden Aminosäuren:

- Rot: negativ (D, E)
- Blau: positiv (K, R)
- Gelb: hydrophob (V, L, I, A)
- Grün: aromatisch (F, W, Y)
- Farblos: (S, M, T, G, H, Q, N, C)

3.5.4 Zirkularer Dichroismus zur Bestimmung der Proteinfaltung

Um die korrekte Faltung und die Verteilung der Sekundärstrukturelemente in der *E. coli* GluTR zu bestimmen, wurden CD-Messungen durchgeführt. Die Berechnung der Sekundärstrukturverteilung erfolgte mit dem Programm Dicroprot und ergab folgende Ergebnisse:

- α -Helix: 67 %
- β -Faltblatt: 17 %
- Turn: 12 %
- Random coil: 3 %

Diese Werte stimmen gut mit den Daten aus dem strukturbasierten Aminosäure-Sequenzalignment zwischen der *E. coli* und *M. kandleri* GluTR überein (Abb. 22). Hieraus wurde für die *E. coli* GluTR ein α -helicaler Gehalt von 57 % und der Gehalt an β -Faltblättern zu 12 % berechnet.

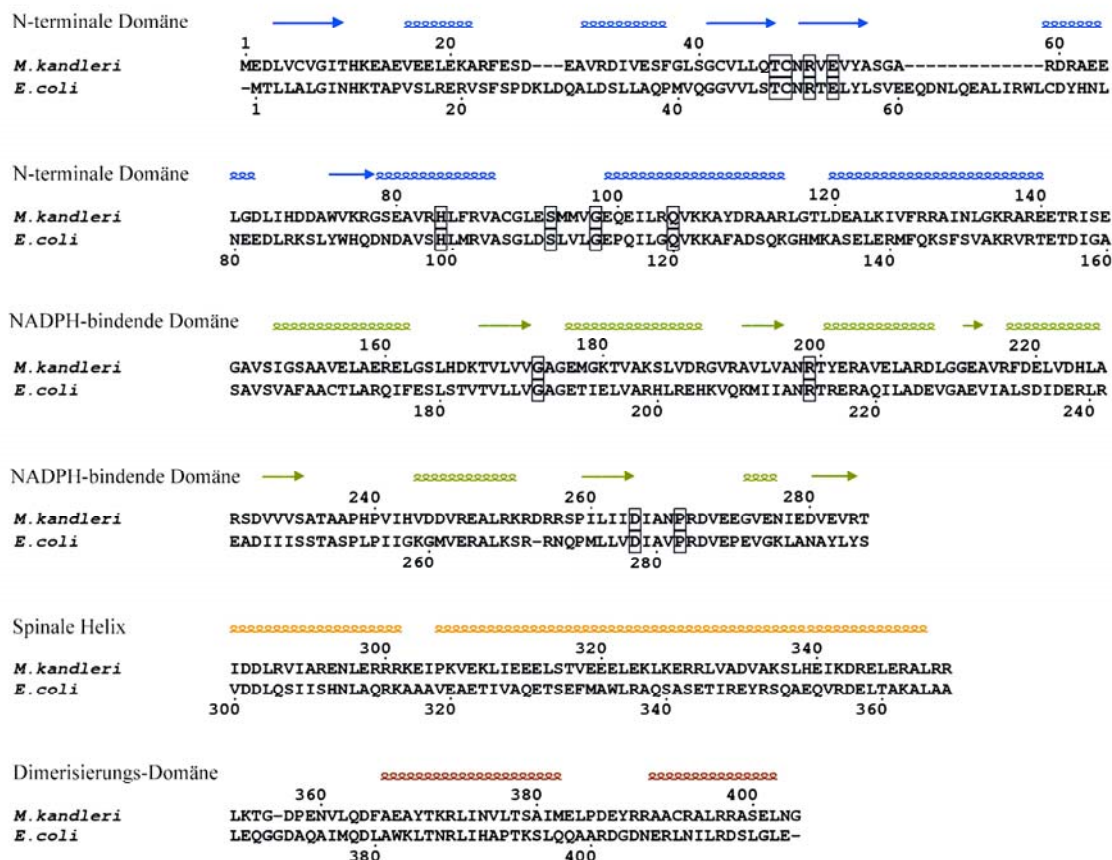


Abbildung 22: Strukturbasierendes Sequenzalignment der GluTR aus *E. coli* und *M. kandleri*. Die konservierten Aminosäuren aller bislang bekannten GluTRs sind eingrahmt. Die Spiralen stehen für α -Helices, die Pfeile markieren β -Faltblätter. Aus dem Vergleich der beiden Alignments ergibt sich für die *E. coli* GluTR ein α -helicaler Gehalt von 57 % und der Gehalt an β -Faltblättern zu 12 %.

In Abbildung 23 sind die CD-Spektren von denaturierter GluTR in Form von den bei der Überproduktion anfallenden Inclusion Bodies, nativer dimerer und aggregierter GluTR dargestellt. Charakteristisch für das Spektrum des nativen Enzyms sind die beiden Minima bei 208 und 222 nm und ein Maximum bei 196 nm, die zusammen diagnostisch für α -helicale Strukturen sind (Johnson, 1990; Kelly & Price, 1997). Das aggregierte Protein unterschied sich hiervon nur durch eine Verschiebung der Minima und Maxima zu größeren Wellenlängen um ca. 5 nm, die korrekt gefalteten Sekundärstrukturen waren also auch bei den

Aggregaten vorhanden. Im Gegensatz hierzu wies das Spektrum des Proteins vor der Rückfaltung keine Hinweise auf vorhandene Sekundärstrukturelemente auf. Vielmehr war das Spektrum der Inclusion Bodies typisch für eine als Zufallsknäuel vorliegende Polypeptidkette (Kelly & Price, 1997).

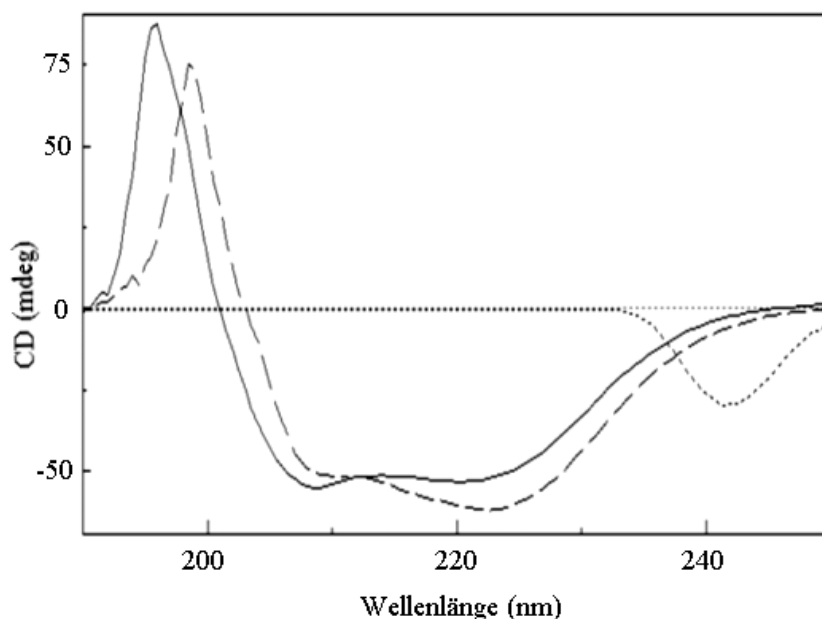


Abbildung 23: CD-Spektren von nativer, dimerer *E. coli* GluTR (—) und gefalteter, aber aggregierter *E. coli* GluTR (— —). Das CD-Spektrum von überproduzierter GluTR vor der Faltung ist als gepunktete Linie dargestellt. Die Probenkonzentration lag bei 0.4 mg/ml in 20 mM Tris-HCl (pH 8.0) und 10 mM NaCl. Die Messungen wurden wie unter 2.7.6 (Material und Methoden) beschrieben durchgeführt.

3.6 Funktionelle Charakterisierung der *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase

Alle der bisher beschriebenen GluTR-Aktivitätstests erforderten die zeitaufwendige und schwer reproduzierbare Isolierung des Reaktionsproduktes GSA. Aufgrund der Instabilität von GSA und der pH-Abhängigkeit der bisher verwendeten Isolierungsmethoden ergaben sich für die gemessenen Werte sehr hohe Standardabweichungen (Kannangara *et al.*, 1984; Chen *et al.*, 1990; Jahn *et al.*, 1991, Lorenz, 1998). Bei der Verwendung von gekoppelten Aktivitätstests, bei denen die GluRS, die GluTR und die GSA-AM das eingesetzte Glutamat in ALA umwandeln, konnten nur qualitative Aussagen bezüglich der GluTR-Aktivität getroffen werden (Chen *et al.*, 1990).

Der in unserer Arbeitsgruppe etablierte GluTR-Aktivitätstest (Lorenz, 1998) hingegen verfolgt die Abnahme des Substrats Glu-tRNA^{Glu}. Als Grundlage diente der klassische Test für Aminoacyl-tRNA Synthetasen. Die Aktivität dieser Enzyme wird bestimmt, indem das [¹⁴C]-markierte Reaktionsprodukt, die aminoacylierte tRNA, durch Säure-Präzipitation und anschließende Szintillationszählung quantifiziert wird (Hoben & Söll, 1985). Im Aktivitätstest für die GluTR wird nun nicht die Produktbildung detektiert, sondern die Substratabnahme, da nur die Radioaktivität des [¹⁴C]Glu-tRNA^{Glu}-Substrates präzipitiert wird, das Reaktionsprodukt [¹⁴C]GSA jedoch in Lösung verbleibt. Diese Vorgehensweise ermöglicht reproduzierbar die sensitive Detektion und Quantifizierung der GluTR-Reaktion. Die Produktbildung wurde durch HPLC-Analysen verifiziert.

In Abbildung 24 ist exemplarisch der Standard-Depletionstest für die *E. coli* GluTR dargestellt. Die spontane Substrathydrolyse wurde als Hintergrund bei der Berechnung von Enzymaktivitäten berücksichtigt.

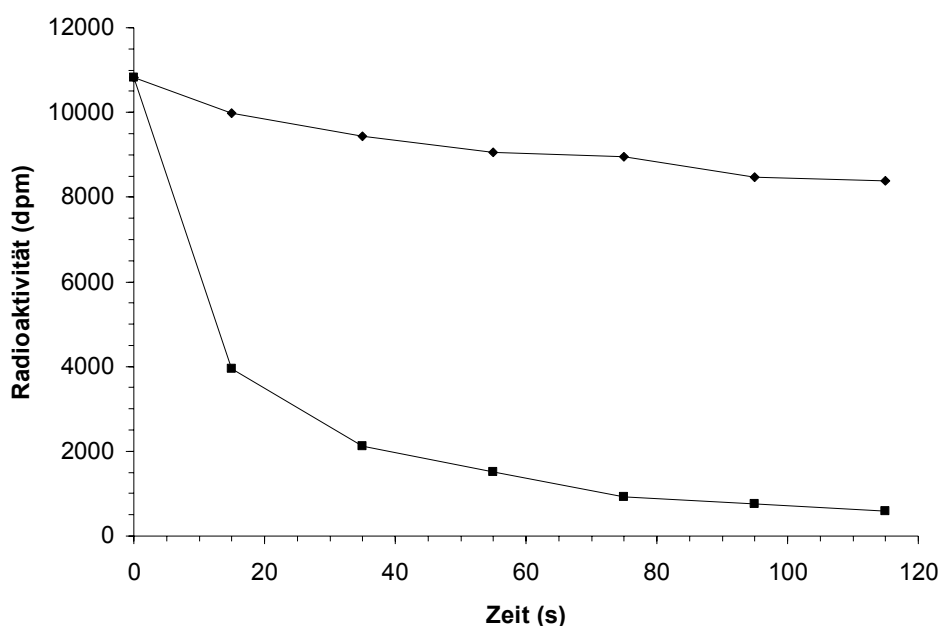


Abbildung 24: Aktivitätsuntersuchung rekombinanter *E. coli* GluTR mittels Depletionstest. 200 nM GluTR wurden mit 2 μ M [¹⁴C]Glu-tRNA^{Glu} bei 37 °C umgesetzt. Gezeigt sind die Substratabnahme in Anwesenheit von GluTR (■) sowie die spontane Hydrolyse des Substrates ohne GluTR (◆). Das Substrat [¹⁴C]Glu-tRNA^{Glu} wurde zu den angegebenen Zeitpunkten mit TCA gefällt und durch Szintillationszählung quantifiziert. Details des Aktivitätstests sind unter 2.8.5 (Material und Methoden) angegeben.

Die Reduktion der Glutamyl-tRNA zu GSA wurde durch HPLC-Analyse nachgewiesen (Abb. 25). Ein Reaktionsansatz, der rekombinante *E. coli* GluTR und *E. coli* [¹⁴C]Glu-tRNA^{Glu} enthielt, wurde in Anwesenheit von NADPH inkubiert und auf eine C₁₈ Reversed-Phase Säule

aufgetragen. Die Chromatographie ergab ein Maximum bei 5 ml. Dieses Elutionsvolumen entspricht dem von GSA. Wurde dem Reaktionsansatz zusätzlich *E. coli* GSA-AM zugefügt, wurde die Komponente, die zuvor an der Position von GSA eluierte, nahezu vollständig in ALA umgewandelt (7.5 ml). Mit diesem Testsystem wurde in der vorliegenden Arbeit eine eingehende Untersuchung der biochemischen Parameter des Enzyms vorgenommen.

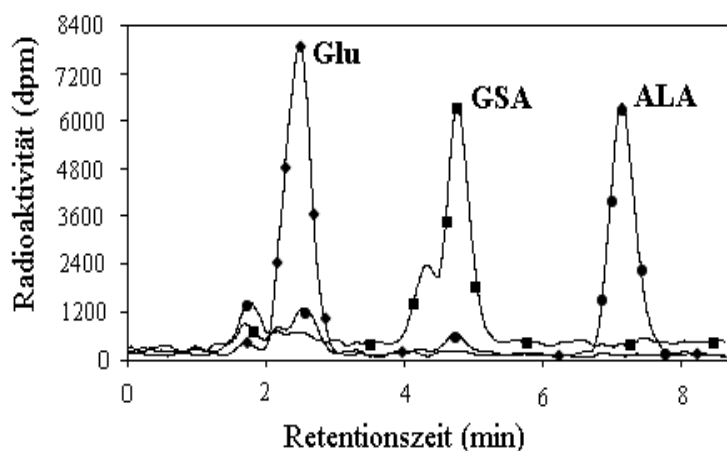


Abbildung 25: Nachweis der GSA-Bildung aus *E. coli* Glu-tRNA^{Glu} katalysiert durch die *E. coli* GluTR mittels HPLC auf einer C₁₈-Umkehrphasen-Säule. Gezeigt ist die Analyse des Substrates *E. coli* [¹⁴C]Glu-tRNA^{Glu} als Hintergrundkontrolle (◆), die Analyse der Reaktionsprodukte aus der Reaktion von *E. coli* [¹⁴C]Glu-tRNA^{Glu} mit *E. coli* GluTR (■) und die Produkte der Reaktion von *E. coli* [¹⁴C]Glu-tRNA^{Glu} mit *E. coli* GluTR und *E. coli* GSA-AM (●). Die C₁₈-Säule wurde zuvor unter Verwendung von [¹⁴C]Glu, [¹²C]GSA und [¹⁴C]ALA geeicht. Die Chromatographie wurde wie unter 2.8.7 (Material und Methoden) beschrieben durchgeführt.

3.6.1 Bestimmung des pH-Optimums und der spezifischen Aktivität von *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase

Für die Bestimmung des pH-Optimums der Enzymaktivität für *E. coli* Hema wurde der Bereich zwischen pH 6 und pH 9 bei 37 °C untersucht (Abb. 26). Für jeden pH-Wert wurde der entsprechende Hintergrund der Substrathydrolyse bestimmt und von der Enzymaktivität abgezogen. Erwartungsgemäß nahm die spontane Deacylierung des Substrats mit steigendem pH-Wert zu. Als optimaler pH-Wert für die GluTR-Katalyse wurde der Bereich zwischen pH 8.0 und 8.5 bestimmt. Alle nachfolgenden Messungen wurden bei pH 8.1 durchgeführt.

Unter den optimalen Bedingungen des Standard-Depletionstest bei 37 °C und pH 8.1 und Verwendung von *E. coli* Glu-tRNA^{Glu} als Substrat, wurde für die *E. coli* GluTR unter Annahme einer Reaktion erster Ordnung (Chapman et al., 1993) eine spezifische Aktivität von 0.47 $\mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ bestimmt. In der vorliegenden Arbeit wurde diese spezifische Aktivität als 100 % Aktivität gesetzt und alle weiteren Meßwerte darauf bezogen.

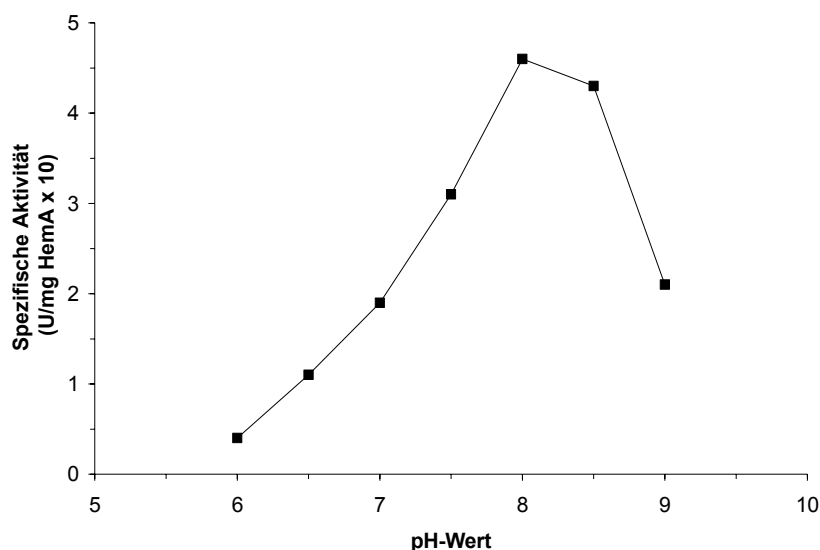


Abbildung 26: Bestimmung des pH-Optimums der enzymatischen Aktivität von *E. coli* GluTR. Für die pH-Titration wurden folgende Puffersysteme verwendet: pH 6-7 MES, pH 7-8 Na-HEPES, pH 8-9 BICINE. Ein Unit entspricht der Umsetzung von 1 μmol glutamyl-tRNA^{Glu}/min. Die Aktivität der GluTR wurde mit Hilfe des Standard-Depletionstests bestimmt. Die Produktbildung im jeweiligen Puffersystem wurde durch HPLC-Analyse nachgewiesen. Als optimaler pH-Wert für die GluTR-Katalyse wurde der Bereich zwischen pH 8.0 und 8.5 bestimmt.

3.6.2 Substrateigenschaften aminoacylierter, unmodifizierter tRNA^{Glu}-Transkripte

Die tRNA^{Glu} aus *E. coli* wird posttranskriptional an fünf Positionen modifiziert. Die modifizierten Nukleoside sind Ψ 13, mnm⁵s²U34, m²A37, T54 und Ψ 55. Diese Modifikationen erhöhen die Stabilität der tRNA^{Glu} und beeinflussen die Erkennung von ATP und Glutamat durch die GluRS (Madore et al., 1999). Es wurde beobachtet, daß bei der tRNA^{Glu} aus den Chloroplasten der Gerste eine 5-Methylamino-Methyl-2-Thiouridin Modifikation der ersten Base des Anticodons (U34) *in vitro* die ALA Synthese beeinflusst (Kannangara et al., 1988). Die Thiol-Gruppe der modifizierten Base dient der GluRS als Erkennungsmerkmal für ihr tRNA^{Glu}-Substrat und wird so zur effizienten Aminoacylierung benötigt (Sylvers et al., 1993). Das Fehlen der Modifikation führt zu einer 520-fachen Verringerung des Wertes für $k_{\text{cat}}/K_{\text{m}}$ für die GluRS für tRNA^{Glu}.

Ausgehend von diesen Beobachtungen sollte untersucht werden, ob Modifikationen der tRNA^{Glu} auch zur Erkennung durch die GluTR benötigt werden. In dieser Arbeit wurde erstmalig die GluTR-Aktivität unter Verwendung von unmodifizierter Glu-tRNA^{Glu} untersucht (Schauer *et al.*, 2002).

Die *in vitro* synthetisierte *E. coli* tRNA^{Glu} wurde von Lennart Randau zur Verfügung gestellt (Randau, 2002). Die tRNA^{Glu} ließ sich unter Verwendung eines Verhältnisses von 1 mol GluRS pro 2 mol tRNA im Reaktionsgemisch trotz fehlender posttranskriptionaler Modifikationen beladen. Hierbei muss der beobachtete 92-fach höhere K_m-Wert der Reaktion beachtet werden (Madore *et al.*, 1999). Die Beladungsrate wurde nach der Reinigung der tRNA bestimmt. Aufgrund der instabilen Esterbindung des aminoacylierten Produktes geht dabei während der Reinigung ein Teil des Substrates verloren. Es wurde eine ca. 15 %ige Beladung bezogen auf die eingesetzte tRNA^{Glu} festgestellt. Aufgrund der Beobachtung, dass unbeladene tRNA die GluTR-Aktivität in *M. kandleri* nicht inhibiert (Moser *et al.*, 1999), wurde die partiell beladene unmodifizierte Glutamyl-tRNA^{Glu} als GluTR Substrat im Depletionstest eingesetzt (Abb. 27).

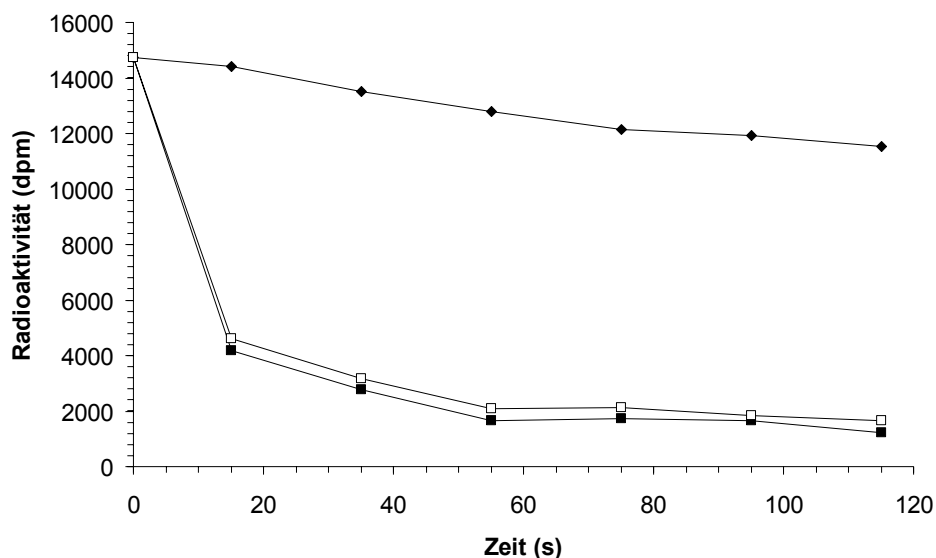


Abbildung 27: Aktivität der *E. coli* GluTR unter Verwendung von aminoacylierter, unmodifizierter *E. coli* tRNA^{Glu}. Gezeigt ist die Abnahme von [¹⁴C]Glu-tRNA^{Glu} durch die enzymatische Aktivität von GluTR. Unmodifizierte, *in vitro* synthetisierte glutamyl-tRNA (□) wurde mit 95 % der Effizienz von modifizierter glutamyl-tRNA (■) umgesetzt. Die Substrathydrolyse in Abwesenheit von Enzym diente als Hintergrundkontrolle (◆).

Die Aktivität der *E. coli* GluTR unter Verwendung der unmodifizierten tRNA^{Glu} beträgt ca. 95 %. Dieses Ergebnis zeigt, dass die posttranskriptionalen Modifikationen der tRNA^{Glu} für die *E. coli* GluTR im Gegensatz zur *E. coli* GluRS keine essentiellen Erkennungsmerkmale darstellen.

3.7 Der Mechanismus der *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase

In der Literatur finden sich keinerlei biochemischen Untersuchungen, die sich mit dem Mechanismus der *E. coli* GluTR auseinandersetzen. Dem für die GluTR aus *M. kandleri* postulierten Mechanismus (Moser *et al.*, 1999) lag als Modell die Funktion der Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) zugrunde. Dieses ursprünglich von Prof. Dr. D. Söll vorgeschlagene Modell ging davon aus, dass der Mechanismus der GluTR der formalen Rückreaktion der GAPDH entspricht (Jahn *et al.*, 1992; O'Neill, *et al.*, 1991). Die durch die GAPDH katalysierte Reaktion verläuft über eine Cystein-Seitenkette im aktiven Zentrum des Enzyms, welche nach der NAD^+ -abhängigen Oxidation des Substrates intermediär ein Acyl-Enzym-Zwischenprodukt ausbildet (Habenicht, 1997).

Zu Beginn dieser Arbeit diente der für die *M. kandleri* GluTR vorgeschlagene Mechanismus als Arbeitshypothese. Wie im Folgenden dargelegt, konnten durch unterschiedliche experimentelle Ansätze die nahe Verwandtschaft zwischen HemA aus dem hyperthermophilen Archaeon *M. kandleri* und dem Bakterium *E. coli* bezüglich ihrer katalytischen Eigenschaften aufgezeigt werden. Der postulierte Katalysemechanismus wurde durch den Nachweis des Acyl-Enzym-Zwischenproduktes bewiesen.

3.7.1 Spektroskopische Eigenschaften der *E. coli* Glutamyl-tRNA Reduktase

Das rekombinant produzierte, renaturierte Enzym wurde bei einer Konzentration von 12 mg/ml im Wellenlängenbereich von 250-600 nm spektroskopisch auf die Anwesenheit von chromophoren Cofaktoren oder prosthetischen Gruppen untersucht. Die Enzymlösung war bei der vorliegenden Konzentration farblos und das erhaltene Absorptionsspektrum zeigte erwartungsgemäß lediglich ein typisches Protein-Absorptionsmaximum bei 280 nm. Auch die Untersuchung mit der sensitiveren Methode der Fluoreszenzspektroskopie auf das Vorhandensein von chromophoren Gruppen ergab kein für Tetrapyrrole, Flavine oder NAD(P)H charakteristisches Emissionsspektrum. Diese Ergebnisse wurden auch durch Aktivitätsmessungen in Anwesenheit von FAD, FMN, PLP oder PMP bestätigt. Hierbei konnte keine Steigerung der GluTR-Aktivität beobachtet werden (Tab. 6). Die Ergebnisse zeigten, dass für die GluTR-Katalyse keine chromophoren prosthetischen Gruppen notwendig sind.

Tabelle 6: Aktivität der GluTR in Anwesenheit potentieller Cofaktoren

Zusatz	Konzentration (mM)	GluTR-Aktivität (%) ^a
FAD	1	105
FMN	1	95
PLP	0.1	100
PMP	0.1	110

^a Die Aktivität der GluTR wurde mit Hilfe des Standard-Depletionstests bestimmt. Die Produktbildung wurde durch HPLC-Analyse nachgewiesen. Die spontane Substrathydrolyse wurde bei der Berechnung der Aktivitäten berücksichtigt.

3.7.2 Für die Aktivität der *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase sind Metallionen notwendig

Um eine mögliche Metallabhängigkeit der *E. coli* GluTR zu untersuchen, wurde das Enzym mit verschiedenen Metallchelatoren behandelt und seine Aktivität mit Hilfe des Standard-Depletionstests bestimmt (Tab. 7). Folgende Chelatoren mit unterschiedlicher Spezifität wurden in Konzentrationen bis zu 10 mM eingesetzt: EDTA, EGTA, 1,10-Phenatrolin und 2,2'-Bipyridin. Alle der verwendeten Substanzen führte in verschiedenem Maße zu einer Verringerung der Enzymaktivität. Durch die Zugabe der zweiwertigen Metallionen Mg^{2+} , Ca^{2+} und Mn^{2+} konnte die Aktivität wieder hergestellt werden.

Tabelle 7: Einfluß von Metallionen auf die Aktivität der *E. coli* GluTR

Zusatz 1 ^a	Zusatz 2 ^b	Konzentration (mM)	GluTR-Aktivität (%) ^c
EDTA		10	45
EGTA		10	50
1,10-Phenatrolin		5	75
2,2'-Bipyridin		5	80
EDTA	MgCl ₂	0.1	55
EDTA	MgCl ₂	1.0	90
EDTA	MgCl ₂	10	105
EDTA	MnCl ₂	10	90
EDTA	CaCl ₂	10	95

^a Die Reaktionsansätze wurden nach Zugabe der angegebenen Verbindungen für 20 min bei RT inkubiert.

^b Vor der Zugabe des zweiten Zusatzes wurde der jeweilige Chelator durch Dialyse gegen GluTR-Assay Puffer ohne MgCl₂ entfernt.

^c Die Aktivität der GluTR wurde mit Hilfe des Standard-Depletionstests bestimmt. Die Produktbildung wurde durch HPLC-Analyse nachgewiesen. Die spontane Substrathydrolyse wurde bei der Berechnung der Aktivitäten berücksichtigt.

3.7.3 Inhibition der *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase durch Schwermetalle

Die Schwermetallverbindungen PtCl_4 , KPdCl_4 und auch Ni^{2+} und Co^{2+} -Ionen inhibierten die GluTR im Standard-Depletionstest sehr effizient (Tab.8). Entsprechende Ergebnisse wurden auch für die GluTR aus Gerste und *M. kandleri* erhalten (Pontoppidan & Kannangara, 1994; Moser *et al.*, 1999). Diese Beobachtungen stimmen auch mit den Untersuchungen überein, die für das Glykolyse-Enzym GAPDH unternommen wurden. Die GAPDH-abhängige Reaktion wird sehr stark durch Schwermetallverbindungen inhibiert, ohne dass das Enzym eine metallabhängige Katalyse durchführt (Aull *et al.*, 1979; Maret, *et al.*, 1999).

Tabelle 8: Inhibition der Aktivität von *E. coli* GluTR durch Schwermetalle

Zusatz ^a	Konzentration (mM)	GluTR-Aktivität (%) ^b
NiCl_2	10	40
CoCl_2	10	10
PtCl_4	0.1	45
PtCl_4	1	10
KPdCl_4	0.1	60
KPdCl_4	1	20

^a Die Reaktionsansätze wurden nach Zugabe der angegebenen Verbindungen für 20 min bei RT inkubiert.

^b Die Aktivität der GluTR wurde mit Hilfe des Standard-Depletionstests bestimmt. Die Produktbildung wurde durch HPLC-Analyse nachgewiesen. Die spontane Substrathydrolyse wurde bei der Berechnung der Aktivitäten berücksichtigt.

Unter Berücksichtigung des Mechanismus der GAPDH könnte die beobachtete Inhibition der GluTR durch Schwermetallverbindungen durch die Interaktion mit einem nukleophilen Aminosäurerest im aktiven Zentrum des Enzyms erklärt werden. Eine alternative Erklärung wäre die Besetzung der potentiellen Bindungsstellen für Mg^{2+} durch die Schwermetallionen.

3.7.4 In Abwesenheit von NADPH besitzt die *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase eine Esterase-Aktivität

Weitere Hinweise, die auf die Existenz eines starken Nukleophils im aktiven Zentrum der *E. coli* GluTR hindeuteten, wurden bei der Durchführung von Aktivitätstests erhalten. Wurde als Kontrollreaktion ein Standard-Depletionstest in Abwesenheit des Cofaktors NADPH durchgeführt, so ergab sich eine Substratabnahme in der Größenordnung, wie sie für die Aktivität der GluTR mit NADPH bestimmt wurde (Abb. 28). Auch die Kinetik dieser

Substratabnahme entsprach der GluTR-katalysierten Reaktion und konnte analog durch eine Reaktion erster Ordnung beschrieben werden. Durch HPLC-Analyse der Reaktionsprodukte konnte gezeigt werden, dass die GluTR in Abwesenheit von NADPH die Hydrolyse des eingesetzten Substrates Glu-tRNA^{Glu} katalysiert. Die in Abbildung 29 dargestellte HPLC-Analyse zeigt die enzymkatalysierte Esterhydrolyse des Substrates unter Bildung von tRNA^{Glu} und Glutamat. Die im Standard-Depletionstest beobachtete spontane Substrathydrolyse entspricht dagegen nur etwa 5 % der beobachteten Aktivität.

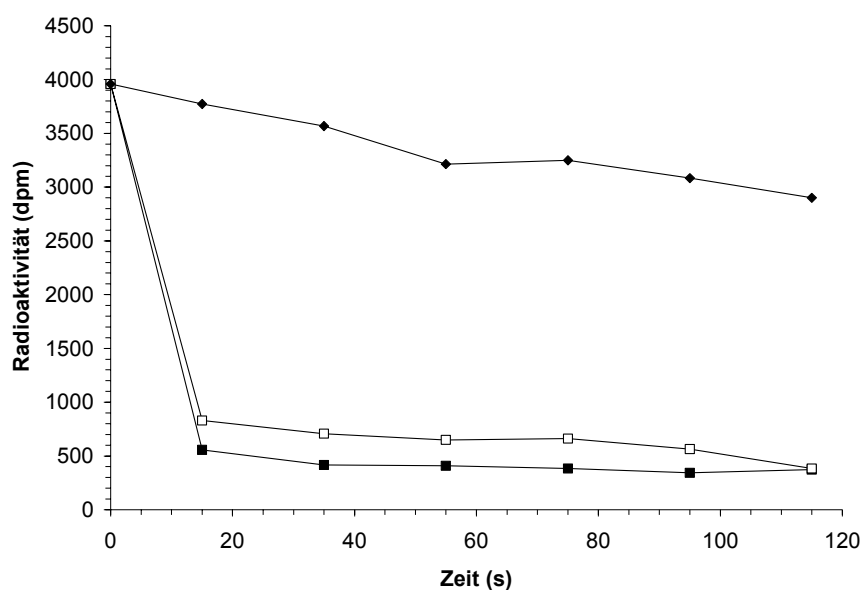


Abbildung 28: Esterase-Aktivität der *E. coli* GluTR. Standard-Depletionstests wurden in Anwesenheit (■) und in Abwesenheit (□) des Cofaktors NADPH durchgeführt. Als Hintergrundkontrolle wurde ein Aktivitätstest ohne GluTR durchgeführt (♦). In Abwesenheit des Cofaktors NADPH ergab sich eine Substratabnahme in der Größenordnung, wie sie für die Aktivität der GluTR mit NADPH bestimmt wurde. Dies entspricht der Esterase-Aktivität der *E. coli* GluTR.

Die Hydrolyse von Substraten verläuft bei vielen Enzymen, wie beispielsweise bei Proteasen, über kovalente Acyl-Enzym Zwischenprodukte, die unter Beteiligung von aktivierten Serin- bzw. Cystein-Resten gebildet werden. Aber nicht nur Proteasen besitzen eine solche Esterase-Aktivität, sondern auch NAD⁺-abhängige Alkoholdehydrogenasen (ALDHs) (Nagradova & Schmalhausen, 1998; Boschi-Muller & Branlant, 1999). Die ALDHs katalysieren die Dehydrogenierung von Aldehyden zu Carbonsäuren gleichzeitig aber auch die Hydrolyse von aktivierten Estern. Es wurde gezeigt, dass in beiden Fällen ein kovalentes Acyl-Enzym Zwischenprodukt unter Beteiligung eines konservierten Cystein-Restes beteiligt ist (Perozich *et al.*, 1999; Abriola *et al.*, 1990). Die formale Rückreaktion dieser Umsetzung ist der GluTR-

Reaktion sehr ähnlich. Deshalb und aufgrund des analogen Verhaltens der *M. kandleri* GluTR wurde gefolgert, dass die *E. coli* GluTR-Katalyse ebenfalls über ein enzymgebundenes Thioester-Zwischenprodukt verläuft, welches in Abwesenheit des Cofaktors NADPH durch Wasser zu tRNA^{Glu} und Glutamat hydrolysiert wird. ALDHs und GAPDHs sind aufgrund ihrer nukleophilen Cystein-Reste im aktiven Zentrum durch Iodacetamid (IAA) und DTNB inhibierbar (Hempel & Pietruszko, 1981; Konoplitskaia *et al.*, 1984).

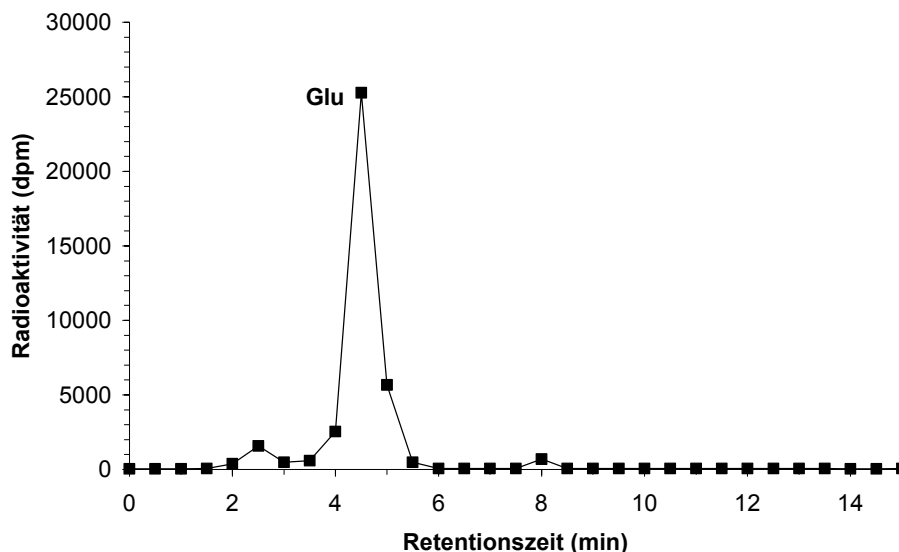


Abbildung 29: Identifizierung der Reaktionsprodukte der GluTR-Reaktion in Abwesenheit von NADPH. Durch die HPLC-Analyse ist nur Glutamat nachweisbar, das Enzym katalysiert also ohne den Cofaktor die Hydrolyse des Substrates Glu-tRNA^{Glu} zu tRNA^{Glu} und Glutamat. Die Chromatographie wurde wie unter 2.8.7 (Material und Methoden) beschrieben durchgeführt.

3.7.5 Chemische Modifikation der *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase zur Bestimmung katalytisch relevanter Aminosäurereste

Mit der klassischen Methode der chemischen Proteinmodifikation wurden Inhibitionsstudien durchgeführt, um die katalytisch wichtigen Aminosäurereste im aktiven Zentrum des Enzyms zu bestimmen. Unter der Annahme eines Nukleophils im aktiven Zentrum der GluTR wurden die Verbindungen Iodacetamid und N-Tosyl-L-phenylalanin-chlormethylketon (TPCK) als Reagenzien zur Modifikation von nukleophilen Aminosäureseitenketten benutzt. Beide Verbindungen zeigen eine Spezifität für Nukleophile im aktiven Zentrum von Enzymen, wie beispielsweise aktivierte Cystein-, Serin- oder auch Histidin-Seitenketten. Die Reagenzien

sind jedoch auch in der Lage, unspezifisch mit nicht aktivierten Seitenketten der Proteinoberfläche zu reagieren. Wie in Tabelle 9 gezeigt, inhibierten die verwendeten Substanzen die GluTR bereits in niedrigen Konzentrationen.

Tabelle 9: Inhibition der Enzymaktivität von *E. coli* GluTR durch Modifikation von Aminosäureresten

Reagenz ^a	Konzentration (mM)	GluTR-Aktivität (%) ^b
Iodacetamid	0.01	60
	0.1	n.m. ^c
TPCK	0.1	20
	1	n.m.
DTNB	0.1	60
	1	20

^a Die Reaktionsansätze wurden für 20 min bei RT mit den entsprechenden Reagenzien inkubiert.

^b Die Aktivität der GluTR wurde mit Hilfe des Standard-Depletionstests bestimmt. Die Produktbildung wurde durch HPLC-Analyse nachgewiesen. Die spontane Substrathydrolyse wurde bei der Berechnung der Aktivitäten berücksichtigt.

^c nicht messbar

Die Ergebnisse lassen auf die Beteiligung eines Cystein-, Serin- bzw. Histidin-Nukleophils schließen. Um die in Frage stehenden Aminosäurereste einzuengen, wurden weitere Modifikationsexperimente mit 5,5'-Dithiobis-2-nitrobenzoesäure (DTNB) vorgenommen. Dieses Reagenz reagiert spezifisch mit Cystein-Seitenketten. Wie aus Tabelle 9 zu entnehmen ist, wurde die Aktivität der GluTR durch DTNB inhibiert. Im Einklang mit den Ergebnissen der Inhibitionsexperimente durch Schwermetallverbindungen wurde aus diesen Ergebnissen auf die Beteiligung von einem oder mehreren Cystein-Resten an der GluTR-Katalyse geschlossen.

3.7.6 Nachweis des Thioester-Zwischenproduktes

Die bisherigen Ergebnisse dieser Arbeit zur biochemischen Untersuchung der *E. coli* GluTR zeigen die nahe Verwandtschaft des Enzyms hinsichtlich seiner katalytischen Eigenschaften zur GluTR aus *M. kandleri* auf. Der für letztere postulierte enzymatische Mechanismus geht von einem nukleophilen Angriff der Sulfhydrylgruppe eines Cysteinrestes des Enzyms auf die aktivierte α -Carboxylgruppe des tRNA-gebundenen Glutamates unter Bildung eines

Thioesters als Zwischenprodukt aus (Abb. 5, Einleitung). Um zu überprüfen, ob dieses vorgeschlagene Reaktionsintermediat vorliegt, wurde die *E. coli* GluTR mit [^{14}C]Glu-tRNA^{Glu} inkubiert und nach anschließender SDS-PAGE das erhaltene Gel durch Autoradiographie auf Enzym-gebundene Radioaktivität untersucht. Die Inkubation des Enzyms mit [^{14}C]Glutamat markierter Glutamyl-tRNA führte zu einer Übertragung der Radioaktivität auf die GluTR (Abb. 30).

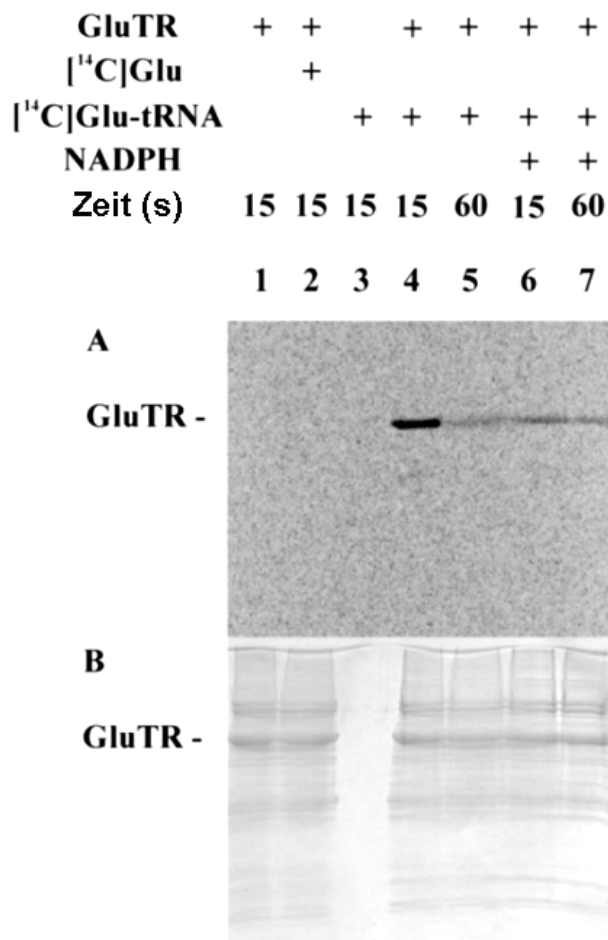


Abbildung 30: Detektion des kovalenten Thioester-Zwischenproduktes. Die Inkubation von *E. coli* GluTR mit [^{14}C]Glutamat markierter Glutamyl-tRNA führte zur Bildung von radioaktivem Enzym. Dieses konnte durch SDS-PAGE isoliert und durch Autoradiographie nachgewiesen werden. Ein derart markiertes Enzym entspricht der Bildung einer Thioester Spezies. Nur die Inkubation von *E. coli* [^{14}C]Glu-tRNA^{Glu} mit *E. coli* GluTR führte zum Transfer der Radioaktivität von der tRNA auf das Enzym (Bahn 4-7). Der Zusatz von NADPH führte zur Freisetzung von GluTR gebundenem [^{14}C]Glu (Bahn 6 und 7) durch die Bildung von GSA. A, Autoradiogramm des mit Coomassie Brilliant Blau gefärbten SDS-PAGE Geles (B).

Ein derart markiertes Enzym entspricht der Bildung eines Thioester-Zwischenproduktes. Die Inkubation mit [^{14}C]Glutamat in An- oder Abwesenheit von *E. coli* tRNA^{Glu} führte nicht zur Bildung von radioaktiv markiertem Enzym. Da die M_r der denaturierten GluTR nicht zugenommen hatte, wurde auf den Transfer von [^{14}C]Glu und nicht von [^{14}C]Glu-tRNA^{Glu} ($M_r \sim 72,000$) auf das Enzym geschlossen. Erwartungsgemäß führte die Zugabe von NADPH zum Reaktionsansatz zur Freisetzung des enzymgebundenen [^{14}C]Glutamats durch die Bildung von [^{14}C]GSA. Längere Inkubationszeiten ohne NADPH führten durch die Esterase-Aktivität vermittelte Hydrolyse ebenso zu einem Verlust der radioaktiven Markierung der GluTR (Abb. 30, Bahn A 5).

3.7.7 Inhibition der Glutamyl-tRNA Reduktase durch Häm

Die Feed-Back Inhibition der GluTR durch das Endprodukt des Syntheseweges wurde für einige GluTRs aus unterschiedlichen Organismen beschrieben (Rieble & Beale, 1991; Pontoppidan & Kannangara, 1994). Die *E. coli* GluTR wurde ebenfalls durch Häm bei einer Konzentration von ca. 2 μM zu 50 % inhibiert (Tab. 10). Zur Bewertung dieses Ergebnisses ist allerdings anzumerken, dass Häm in mikromolaren Konzentrationen eine Vielzahl von Enzymen unspezifisch inhibiert, die keiner physiologischen Hämregulation unterliegen. Beispielsweise wurde auch eine Inhibition verschiedener RNA- und DNA-bindender Proteine und Restriktionsendonukleasen bei Hämkonzentrationen von 1-5 μM beobachtet (Haile *et al.*, 1990).

Tabelle 10: Inhibition der Aktivität von *E. coli* GluTR durch Häm

Zusatz ^a	Konzentration (μM)	GluTR-Aktivität (%) ^b
Häm	1	70
	2	50
	4	30
	8	20

^a Häm wurde 10 min vor dem Start der Reaktion zugesetzt.

^b Die Aktivität der GluTR wurde mit Hilfe des Standard-Depletionstests bestimmt. Die Produktbildung wurde durch HPLC-Analyse nachgewiesen. Die spontane Substrathydrolyse wurde bei der Berechnung der Aktivitäten berücksichtigt.

3.7.8 Inhibition der *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase durch das Substrat-analogon Glutamycin

Das Antibiotikum Puromycin greift inhibitorisch in die Proteinbiosynthese ein. Durch die Imitation des 3'-Endes der Tyrosyl-tRNA^{Tyr} wird das Molekül von der A-Bindungsstelle der Ribosomen erkannt. Aufgrund der inerten Amidbindung des Puromycins kann bei der Peptidsynthese keine weitere Transpeptidierung stattfinden und infolge dessen kommt die Proteinbiosynthese zum Erliegen (Nicholson *et al.*, 1982).

Das vom Puromycin abgeleitete Glutamycin imitiert das 3'-Ende der aminoacylierten tRNA^{Glu} (Abb. 31).

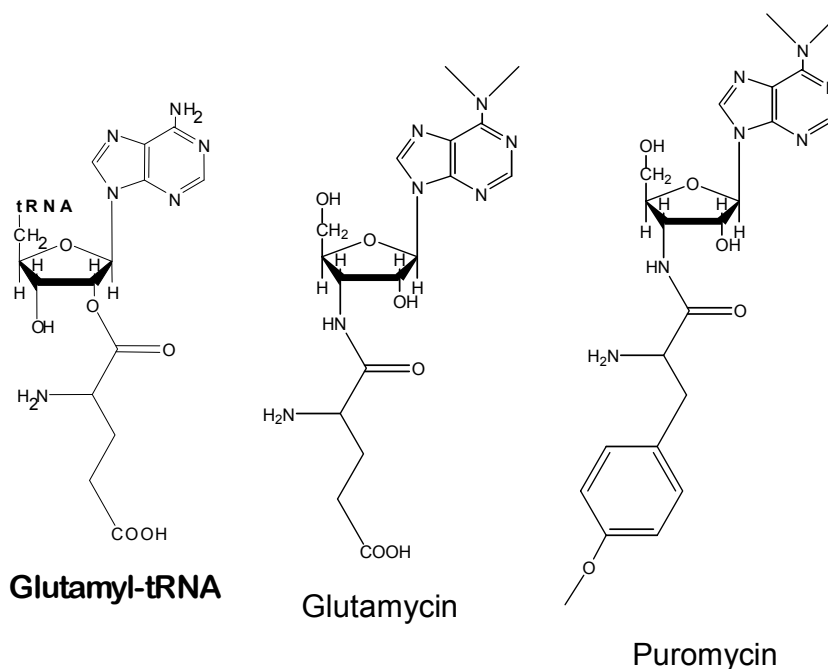


Abbildung 31: Vergleich der Strukturen des Glu-tRNA^{Glu}-Analogons Glutamycin mit Puromycin und dem aminoacylierten 3'-Ende der tRNA^{Glu}.

Da das Glutamat im Glutamycin nicht über eine hydrolyselabile Esterbindung, sondern über eine Amidbindung verknüpft ist, wurde erwartet, dass es zwar von der GluTR erkannt aber nicht umgesetzt werden kann. Zur Analyse der Substraterkennung durch die *E. coli* GluTR wurden die in Tabelle 11 zusammengefaßten Inhibitionuntersuchungen durchgeführt.

Tabelle 11: Inhibition der Aktivität der *E. coli* GluTR durch verschiedene Substrate

Zusatz	Konzentration (mM)	GluTR-Aktivität (%) ^a
modifizierte <i>E. coli</i> tRNA ^{Glu}	0.001	100
	0.01	105
	0.1	95
unmodifizierte <i>E. coli</i> tRNA ^{Glu}	0.001	95
	0.01	100
	0.1	100
Glutamycin	0.1	100
	1	55
	3	30
	5	10
L-Glutamat	10	105

^a Die Aktivität der GluTR wurde mit Hilfe des Standard-Depletionstests bestimmt. Die Produktbildung wurde durch HPLC-Analyse nachgewiesen. Die spontane Substrathydrolyse wurde bei der Berechnung der Aktivitäten berücksichtigt.

Freies Glutamat und deacylierte tRNA^{Glu} inhibierten die GluTR nicht. Glutamycin hingegen führte bei einer Konzentration von ca. 1 mM zu einer 50 %igen Inhibition der Reaktion. Hieraus wurde gefolgert, dass für die Substraterkennung durch die GluTR sowohl der Glutamat-Anteil als auch zumindest das 3'-Ende der tRNA notwendig ist.

3.8 Mutagenesestudien zum Verständnis des Mechanismus der *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase

Die bisherigen Untersuchungen in dieser Arbeit deuteten auf die Beteiligung zumindest einer nukleophilen Cystein-Seitenkette an der durch die *E. coli* GluTR katalysierten Reaktion hin. Dies entspricht auch dem mechanistischen Modell für die *M. kandleri* GluTR (Moser *et al.*, 1999) und die für dieses Enzym durchgeführten Mutagenesestudien. Des weiteren werden diese Ergebnisse auch durch Sequenz-Alignments der GluTR aus unterschiedlichen Spezies belegt. In den in allen bislang bekannten GluTR-Sequenzen am höchsten konservierten Bereichen befindet sich die Aminosäure Cystein (Cys-50 in *E. coli*). Um den entsprechenden nukleophilen Cystein-Rest in der *E. coli* GluTR zu identifizieren, wurden durch ortsgerichtete Mutagenese alle drei in dem Protein vorhandenen Cystein-Seitenketten nacheinander gegen

Serin-Seitenketten ausgetauscht. Die entsprechenden GluTR-Varianten C50S, C74S und C170S wurden analog dem Wildtyp (WT) rekombinant produziert und renaturiert. Die erhaltenen Mutanten wurden unter Verwendung des Standard-Depletionstests kinetisch sowohl in Bezug auf ihre Reduktase- als auch auf ihre Esterase-Aktivität untersucht.

3.8.1 Die *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase-Variante C50S besitzt weder Reduktase- noch Esterase-Aktivität

Um die für die GluTR-Katalyse essentiellen Cystein-Reste zu identifizieren, wurden alle drei Cysteine der *E. coli* GluTR jeweils gegen Serin ausgetauscht. Die Ergebnisse der Aktivitätsuntersuchungen zu den einzelnen Mutanten sind in Tabelle 12 zusammengefaßt. Die Aktivitäten der GluTR-Varianten C74S und C170S unterscheiden sich nicht signifikant von der Aktivität des Wildtypenzym. Im Gegensatz hierzu besitzt die Mutante C50S keinerlei katalytische Aktivität mehr. Der Cystein-Rest 50 ist der einzige in allen bislang bekannten GluTR-Proteinen konservierte Cystein-Rest. Der konservative Aminosäureaustausch C50S führt dazu, das die Mutante weder eine messbare Reduktase- noch eine messbare Esterase-Aktivität mehr besitzt. Diese Ergebnisse belegen eindeutig, dass sowohl die beobachtete Reduktase-Aktivität als auch die Esterase-Aktivität der *E. coli* GluTR durch die Sulfhydryl-Gruppe von Cystein-Rest 50 vermittelt wird.

Tabelle 12: Reduktase- und Esterase-Aktivitäten der *E. coli* GluTR-Varianten C50S, C74S und C170S

GluTR-Variante	Reduktase-Aktivität (%) ^a	Esterase-Aktivität (%) ^b
Wildtyp	100	100
C50S	n.m. ^c	n.m.
C74S	110	100
C170S	100	90

^a Die Aktivität der GluTR wurde mit Hilfe des Standard-Depletionstests bestimmt. Die Produktbildung wurde durch HPLC-Analyse nachgewiesen. Die spontane Substrathydrolyse wurde bei der Berechnung der Aktivitäten berücksichtigt.

^b Die GluTR-Aktivität wurde in Abwesenheit von NADPH bestimmt.

^c nicht messbar

Der beobachtete vollständige Aktivitätsverlust der *E. coli* GluTR-Variante C50S steht im Einklang mit den Ergebnissen für andere Enzyme, die ein Acyl-Enzym-Zwischenprodukt ausbilden. So kann das Cystein-Nukleophil im aktiven Zentrum von Cystein-Proteasen funktionell nicht durch Serin ersetzt werden (Beveridge, 1996). Diese Ergebnisse lieferten den endgültigen Beleg für die Funktion des Cystein-Restes 50 als Nukleophil im aktiven Zentrum der *E. coli* GluTR. Über Cys-50 kann ein Thioester-Zwischenprodukt ausgebildet werden, dass in Anwesenheit von NADPH durch Reduktion zum Aldehyd umgesetzt und ohne den Cofaktor hydrolytisch gespalten wird.

Die bisher in dieser Arbeit beschriebenen Ergebnisse zeigen, dass die *E. coli* GluTR über den nukleophilen Cystein-Rest 50 mit dem Substrat ein kovalentes Thioester-Zwischenprodukt bildet. Dies entspricht dem in Abbildung 5 in der Einleitung gezeigten, für die GluTR aus *M. kandleri* vorgeschlagenen, enzymatischen Mechanismus. Zusammen mit der im Verlauf dieser Arbeit gelösten Kristallstruktur der *M. kandleri* GluTR (Moser *et al.*, 2001), die erstmals eine strukturbasierte Analyse der GluTR-Katalyse ermöglichte und einer theoretischen Analyse der Funktion von Pflanzen GluTRs (Schubert *et al.*, 2002; Moser *et al.*, 2002), scheinen der vorgeschlagene Mechanismus und die Struktur der GluTR von allgemeiner Gültigkeit für diese Enzymfamilie zu sein.

3.9 Untersuchungen zur Substratspezifität der *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase

Die im Verlauf dieser Arbeit gelöste Struktur der GluTR im Komplex mit Glutamycin aus dem hyperthermophilen Archaeon *M. kandleri* (Moser *et al.*, 2001) ermöglichte, aufgrund der Übereinstimmung der katalytischen und strukturellen Merkmale, die Übertragung der Strukturinformation auf das *E. coli* Enzym. Aufgrund der hohen Sequenzidentität von 35 % zwischen beiden Enzymen und der Tatsache, dass alle Aminosäuren im aktiven Zentrum (einzige Ausnahme: Q116) identisch sind, wurde davon ausgegangen, dass die Substraterkennung im aktiven Zentrum der *E. coli* GluTR auf die gleiche Weise wie bei der *M. kandleri* GluTR erfolgt. In Abbildung 32 ist ein hieraus abgeleitetes Modell des aktiven Zentrums der *E. coli* GluTR abgebildet.

Die wesentliche Wechselwirkung am unteren Ende der Substratbindungstasche ist die zweifache Salzbrücke zwischen dem Arginin-Rest 52 und der γ -Carboxylatgruppe des tRNA-gebundenen Glutamat-Substratmoleküls. Diese Salzbrücke scheint essentiell für die

Substraterkennung, insbesondere für die Differenzierung zwischen Glutamat und Glutamin, zu sein. In analoger Weise wird die Carboxyl-Funktion des Substrats auch bei der Aspartyl-tRNA Synthetase (Eiler *et al.*, 1999) und der Glutamyl-tRNA Synthetase (Sekine *et al.*, 2001) durch ein konserviertes Arginin spezifisch erkannt.

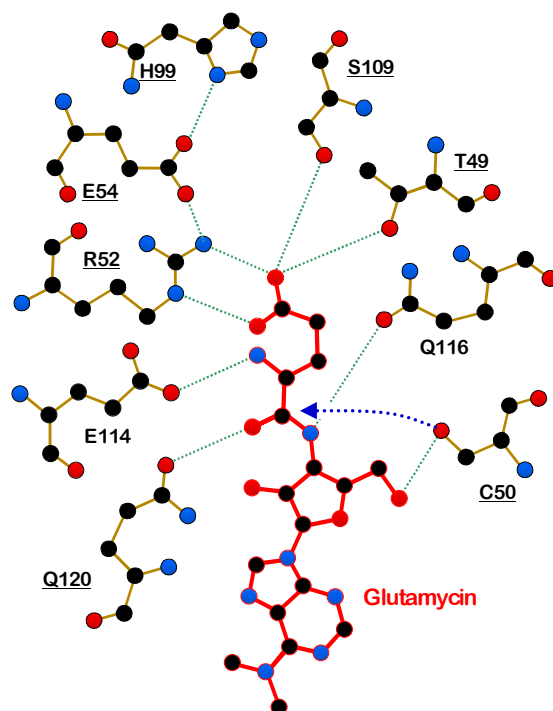


Abbildung 32: Modell des aktiven Zentrums der *E. coli* Glutamyl-tRNA Reduktase mit dem Inhibitor Glutamycin (rote Bindungen). Dieses Modell wurde anhand der Daten aus der Kristallstruktur der GluTR aus *M. kandleri* erstellt und unter Berücksichtigung des strukturbasierenden Sequenzalignments auf die GluTR aus *E. coli* übertragen. Der Glutamat-Anteil des Glutamycins wird durch ein Netzwerk aus spezifischen Wasserstoffbrücken-Bindungen (grün gepunktete Linien) erkannt. Der erste Schritt der GluTR-Katalyse, der nukleophile Angriff von Cys-50 auf den Carbonyl-Kohlenstoff, ist angedeutet (blau gepunkteter Pfeil). Konservierte Aminosäurereste sind unterstrichen.

Mit Hilfe des künstlichen Substrats [^{14}C]Gln-tRNA^{Glu} sollte die Funktion der Salzbrücke näher charakterisiert und durch einen Austausch des Arginin-Restes 52 zu Glutamin eine Änderung der Substratspezifität der GluTR von tRNA-gebundenen Glutamat zu Glutamin erzielt werden. Dabei wurde davon ausgegangen, dass das eingefügte Glutamin aufgrund der Ladungsverhältnisse besser mit an tRNA gebundenem Glutamin als mit Glutamat in Wechselwirkung treten kann.

3.9.1 Aktivität der *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase-Varianten R52Q und R52K mit dem artifiziellen Substrat [^{14}C]Gln-tRNA^{Glu}

Aus dem Modell des aktiven Zentrums der *E. coli* GluTR mit dem Substratanalog Glutamycin (Abb. 32) war ersichtlich, dass besonders der Argininrest 52 für die Koordination der für Glutamat charakteristischen γ -Carboxylatgruppe verantwortlich ist. Da Glutamin an gleicher Stelle eine Amino- anstatt einer Säuregruppe trägt, sollte der positiv geladene Aminosäurerest Arginin 52 gegen ein ungeladenes Glutamin bzw. ein positiv polarisiertes aber größeres Lysin ausgetauscht werden. Die analog dem Wildtyp produzierten und renaturierten GluTR-Varianten R52K und R52Q wurden mit Hilfe des Standard-Depletionstest auf ihre Aktivität untersucht (Tab. 13).

Tabelle 13: Reaktion von *E. coli* Wildtyp GluTR und den Varianten R52K und R52Q mit [^{14}C]Glu-tRNA^{Glu} und [^{14}C]Gln-tRNA^{Glu}

	GluTR WT			GluTR R52K			GluTR R52Q		
Zeit (s)	10	40	100	10	40	100	10	40	100
[^{14}C]Glu-tRNA ^{Glu}	88%	95%	97%	22%	35%	53%	0%	0%	1%
[^{14}C]Gln-tRNA ^{Glu}	55%	67%	79%	18%	31%	42%	2%	4%	9%

Die Reaktionsansätze enthielten 2 mM NADPH, 1 μM Substrat, 3 mg/ml BSA und 5 μM Enzym. Die Ansätze wurden bei 37 °C und 500 rpm inkubiert und nach 10, 40 und 100 s je 15 μl gestoppt, das tRNA-Substrat präzipitiert und quantifiziert. Die angegebenen Werte entsprechen dem Anteil des Substrats, der bezogen auf die eingesetzte Menge (100%), umgesetzt wurde.

Interessanterweise setzte das Wildtypenzym das künstliche Substrat Gln-tRNA^{Glu} ebenfalls um. Das Wildtypenzym konnte allerdings die fehlbeladene tRNA schlechter als das natürliche Substrat umsetzen. Die Salzbrücke zwischen Arginin und Substrat kann wahrscheinlich mit dem Glutamin nicht mehr vollständig ausgebildet werden. Diese Ergebnisse führen zu der Vermutung, dass die Salzbrücke zwischen dem Arginin 52 und der γ -Carboxylatgruppe nicht allein für die Substraterkennung und die Diskriminierung zwischen Glutamat und Glutamin essentiell ist. Der tRNA-Anteil des Substrats spielt anscheinend eine mindestens ebenso wichtige Rolle in der Substraterkennung wie das Arginin 52.

Aus der Tabelle ist zu erkennen, dass die Spezifität der R52Q-Mutante verändert wurde. Die Aktivitätstests der R52Q-Mutante mit dem natürlichen Substrat zeigen, dass die R52Q-Variante keinerlei detektierbare Aktivität zeigt. Durch den Austausch von Arginin zu

Glutamin ist das Enzym anscheinend nicht mehr in der Lage, das Substrat zu binden oder umzusetzen. Diese Ergebnisse bestätigen die essentielle Funktion des Arginin 52 für die Bindung und den Umsatz des Substrats.

Mit dem Einsatz des künstlichen Substrats [^{14}C]Gln-tRNA^{Glu} konnte ein Teil der Aktivität der R52Q-Variante wieder hergestellt werden. Das in die GluTR eingefügte Glutamin 52 kann offensichtlich mit dem Glutamin im künstlichen Substrat Gln-tRNA^{Glu} interagieren, was zuvor mit der γ -Carboxylatgruppe des Glutamats im natürlichen Substrat Glu-tRNA^{Glu} nicht möglich war. Auf diese Weise konnte durch den Austausch von Arginin 52 zu Glutamin 52 eine Änderung der Enzymspezifität von tRNA-gebundenem Glutamat zu Glutamin erreicht werden.

Die Aktivitätstests der R52K-Variante zeigten eine verringerte Aktivität der Mutante mit dem natürlichen Substrat. Im Gegensatz zur R52Q-Variante fand bei Verwendung des künstlichen Substrats keine Steigerung der Aktivität, sondern eine weitere Verringerung der Aktivität statt. Dies deutet daraufhin, dass die Wechselwirkung zwischen dem eingefügten Lysin und Glutamin etwas schwächer ist, als die zwischen Lysin und Glutamat. Dies zeigt deutlich, dass die Mutation von Arginin 52 zu Lysin 52 zu einem klaren Spezifitätsverlust des Enzyms bezüglich Glutamin versus Glutamat führt. In Kombination mit dem Spezifitätswechsel der Mutante R52Q deuten diese Mutantenstudien auf eine wichtige, wenn auch nicht alleinige Rolle von Arginin 52 bei der Aminosäureerkennung des Substrats hin. Allerdings bedarf es für eine endgültige Aussage noch der Diskriminierung von Reduktase- und Esteraseaktivität der verschiedenen Enzyme und der Identifikation des generierten Produktes nach der Umsetzung von Gln-tRNA^{Glu}.

3.10 Funktionelle Charakterisierung von genetisch selektionierten *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase-Mutanten

Mittels chemischer Mutagenese wurden aus ALA-prototrophen *E. coli*-Zellen 50 ALA-auxotrophe *hemA*⁻-Stämme genetisch selektioniert (Nakayashiki *et al.*, 1995). Nach der Sequenzierung der mutierten *hemA*-Gene verblieben acht Mutanten mit verschiedenen Punktmutationen (Tab. 14). Es folgte die Klonierung der mutierten *hemA*-Gene aus den *hemA*⁻-Stämmen als *BlnI*-*Bam*HI-Fragmente in pET15b-Plasmidvektoren. In dieser Form wurden uns die acht Mutanten zur Verfügung gestellt. Die Mutagenese und Selektion waren im Labor von Prof. Dr. H. Inokuchi (Kyoto University, Sakyo-ku) durchgeführt worden. Die Klonierung

erfolgte im Labor von Prof. Dr. D. Söll (Yale University, New Haven) und Dr. U. Thomann (Genolab, Boston) sequenzierte die 50 isolierten Gene.

Zur Untersuchung der enzymatischen Grundlage für den beobachteten Phänotyp (ALA-Auxotrophie) der Mutanten wurden die mutierten *hemA*-Gene exprimiert und die Gen-produkte analog dem Wildtyp gereinigt. Die anschließenden Aktivitätstests zeigten, dass die meisten der Mutanten weder eine Esterase- noch eine Reduktase-Aktivität besaßen (Tab. 14). Nur die GluTR-Mutante G191D wies eine Esterase-Aktivität aber keine Reduktase-Aktivität mehr auf.

Tabelle 14: Reduktase- und Esterase-Aktivitäten der genetisch selektionierten *E. coli* GluTR-Mutanten

GluTR-Variante	Reduktase-Aktivität (%) ^a	Esterase-Aktivität (%) ^b
Wildtyp	100	100
G7D	n.m. ^c	n.m.
R314C	n.m.	n.m.
G44C/S105N/A326T	n.m.	n.m.
G106N	n.m.	n.m.
S145F	n.m.	n.m.
S22L/S164F	n.m.	n.m.
E114K	n.m.	n.m.
G191D	n.m.	105

^a Die Aktivität der GluTR wurde mit Hilfe des Standard-Depletionstests bestimmt. Die Produktbildung wurde durch HPLC-Analyse nachgewiesen. Die spontane Substrathydrolyse wurde bei der Berechnung der Aktivitäten berücksichtigt.

^b Die GluTR-Aktivität wurde in Abwesenheit von NADPH bestimmt.

^c nicht messbar

Die Kristallstruktur der *M. kandleri* GluTR macht zusammen mit dem strukturbasierten Aminosäure-Sequenzalignment zwischen der *E. coli* und *M. kandleri* GluTR (Abb. 22) den Verlust der Reduktase-Aktivität der Mutante G191D verständlich. Der Aminosäureaustausch betrifft das zweite Glycin im GXGXXI-Motif, das den Cofaktor NADPH erkennt (Carugo & Argos, 1997). Diese Mutation in der NADPH-Bindungsdomäne verhindert demnach die Bindung des NADPH an das Enzym und infolgedessen die Reduktion des Substrates.

Zusammengefaßt, kann die biochemische Analyse die beobachtete ALA-Auxotrophie auf den Verlust der Reduktase-Aktivität der acht genetisch selektionierten Mutanten zurückführen. Die getroffenen Aminosäurereste sind also essentielle Funktions-Strukturmerkmale des Enzyms (Schauer *et al.*, 2002).

3.11 Wechselwirkung der *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase mit der Glutamyl-tRNA Synthetase und Glutamat-1-semialdehyd-2,1-Aminomutase

In Tieren, Pilzen und einigen Bakterien wird ALA in einer einstufigen Kondensationsreaktion von Succinyl-CoA und Glycin durch die ALA Synthase synthetisiert (Kikuchi *et al.*, 1958; May *et al.*, 1995). Die tRNA-abhängige Bildung von ALA in Pflanzen und den meisten Bakterien hingegen benötigt einerseits die geregelte Zufuhr von aminoacylierter tRNA^{Glu} von der GluRS zur GluTR und andererseits die aufeinander abgestimmte Aktion von GluTR und GSA-AM, die beide metabolisch durch den Aldehyd GSA verknüpft sind (Abb. 2). Die hohe chemische Reaktivität des GSA im Cytosol läßt die direkte Überführung des Aldehyds von der GluTR zur GSA-AM und damit die Gewährleistung einer effizienten Bildung von ALA vernünftig erscheinen. Die ungewöhnliche V-förmige Struktur der *M. kandleri* GluTR legt eine attraktive Lösung für dieses metabolische Problem nahe. Ordnet man die GluTR neben der ähnlichen dimeren Struktur der GSA-AM aus *Synechococcus* sp. (Hennig *et al.*, 1997) an, so fällt auf, dass das von der GSA-AM eingenommene Volumen genau in die von den GluTR-Monomeren ausgebildete Lücke passt. Die Verbindung und Annäherung der beiden Enzyme entlang ihrer zweifachen Symmetrieachsen führt zu einem Modellkomplex mit bemerkenswerter Oberflächenkomplementarität (Abb. 33 B). In gleicher Weise läßt sich die *E. coli* tRNA^{Glu} zu diesem *in silico* Modell hinzufügen, ohne dass es zu sterischen Konflikten kommt (Abb. 33 C/D). Stattdessen teilen sich die tRNA^{Glu} und die GSA-AM Bindungsflächen miteinander. Dies weist auf eine Stabilisierung dieses ternären Komplexes durch die wechselseitige Erkennung zwischen den drei Komponenten hin. Das beachtlichste Ergebnis dieses vorgeschlagenen GluTR/tRNA^{Glu}/GSA-AM Komplexes (Moser *et al.*, 2001) ist jedoch, dass der mutmaßliche Eingang zum aktiven Zentrum der beiden GSA-AM Monomere (Hennig *et al.*, 1997) direkt gegenüber einer teilweise geöffneten Vertiefung in der katalytischen Domäne der GluTR liegt. Diese Vertiefung und die Glutamat Bindungstasche der GluTR sind lediglich durch den Argininrest 52 (Zählweise für *E. coli*) voneinander getrennt und durch den konservierten Histidinrest 99 abgeschirmt ("Ausgang"). Der vorgeschlagene Komplex könnte also darauf hindeuten, dass das GluTR Reaktionsprodukt GSA das Enzym über diese "Hintertür" der Glutamat Bindungstasche verläßt und direkt zum aktiven Zentrum der GSA-AM tunnelt, ohne der wäßrigen Umgebung des Cytosols ausgesetzt zu werden. Bislang gab es aber keine experimentellen Belege für die direkte Interaktion zwischen der GluTR und der GSA-AM.

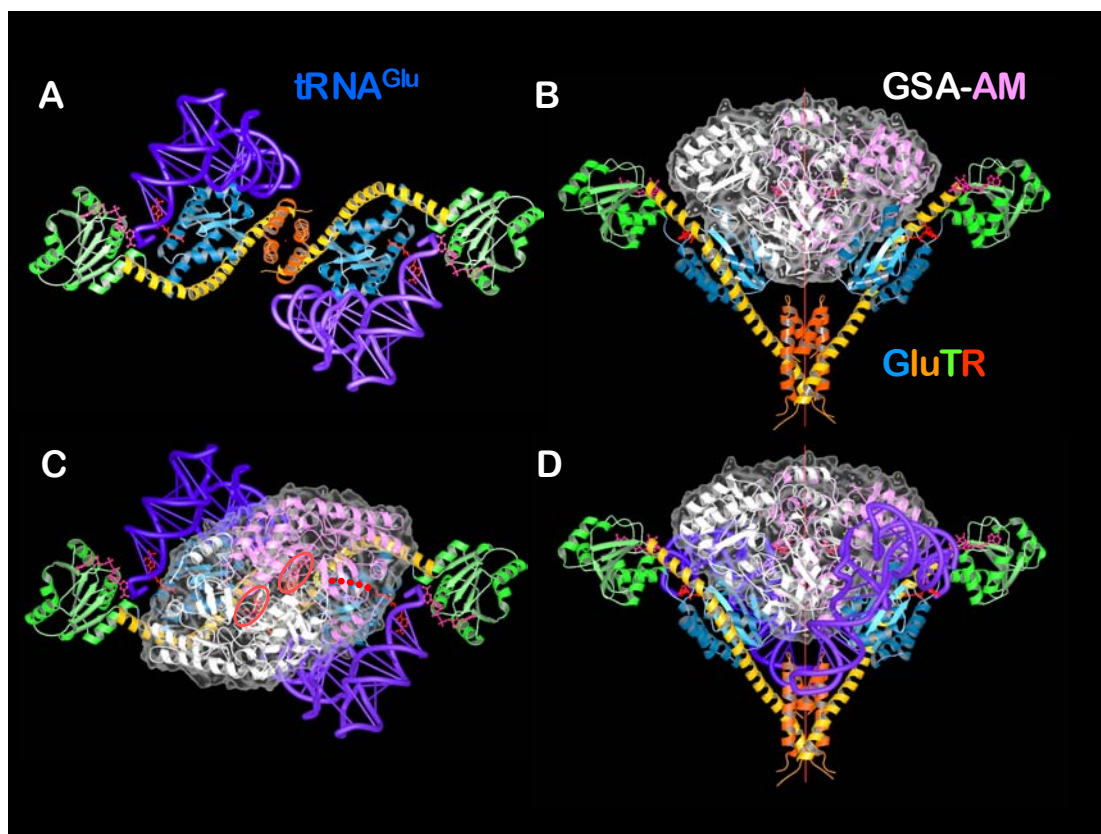


Abbildung 33: *In silico* modellierte Komplexe zwischen GluTR, tRNA^{Glu} und GSA-AM, basierend auf der Kristallstruktur von *M. kandleri* GluTR (Moser *et al.*, 2001). Gezeigt ist: A, Modell von GluTR/2tRNA^{Glu} entlang der zweizähligen Achse betrachtet. B, die V-Form der GluTR (blau, grün, gelb, rot) bietet genügend Platz um die GSA-AM (weiß und pink), zu binden. Die durchsichtige Oberfläche der GSA-AM (grau) läßt die erhebliche Oberflächenkomplementarität zwischen den beiden Protein-Dimeren, die sich eine zweizählige Symmetrieachse teilen, erkennen. C und D, die Kombination der Komplexe A und B gibt Anlaß zu dem vorgeschlagenen ternären Komplex 2GluTR/2tRNA^{Glu}/2GSA-AM, ohne dass es zu sterischen Behinderungen zwischen den einzelnen Komponenten kommt. Der vermutete Weg des Substrates GSA vom aktiven Zentrum der GluTR zu dem der GSA-AM ist in C als rot gepunktete Linie angedeutet. Die aktiven Zentren der GSA-AM Monomere sind durch zwei rote Ellipsen hervorgehoben.

Über die Kontrolle des Metabolitflusses in Form der Glu-tRNA^{Glu} zwischen der Protein- und der Hämbiosynthese ist nur soviel bekannt, dass intrazellulär die Konzentration an freien aminoacylierten tRNAs verschwindend gering sind. Diese liegen hingegen als ternäre Komplexe von EF-Tu/aatRNA/GTP vor und stehen in dieser Form für die Peptidsynthese am Ribosom zur Verfügung (Clark & Nyborg, 1997; Nissen *et al.*, 1996; Berchtold *et al.*, 1993).

Dies konnte auch durch Experimente in unserem Labor bestätigt werden die zeigten, dass der ternäre Komplex aus EF-Tu, Glu-tRNA^{Glu} und GTP in Enzymkinetiken ein schlechteres Substrat für die *E. coli* GluTR darstellte als freie Glu-tRNA^{Glu}. Die direkte Interaktion von GluRS und GluTR würde die Konkurrenz der *in vivo* nur in sehr geringen Konzentrationen vorliegenden GluTR mit den reichlich vorhandenen Komponenten der Proteinbiosynthese um das Substrat Glu-tRNA^{Glu} vermeiden. Ein solches direktes tRNA-Channeling zur Hämbiosynthese böte eine Lösung für dieses metabolische Problem. Derartige hochspezifische Komplexe zwischen der GluRS und der GluTR in Anwesenheit von Glu-tRNA^{Glu} konnten für die Enzyme aus *Chlamydomonas reinhardtii* nachgewiesen werden (Jahn, 1992). Auch aus *E. coli* wurden aus mit [³⁵S]Methionin supplementierten Zellen und *in vitro* Transkriptions/Translations-Ansätzen Komplexe mit relativen molekularen Massen von 117,000 bzw. 175,000 mit GluTR-Aktivität isoliert (Chen *et al.*, 1996). Jedoch wurden diese Komplexe nicht weiter auf andere Aktivitäten untersucht.

Die Möglichkeit einer Wechselwirkung von GluTR und GSA-AM sollte deshalb mit Hilfe von Co-Immunopräzipitationsexperimenten untersucht werden, nachdem Versuche derartige Komplexe durch nativer PAGE und Gelpermeationschromatographie nachzuweisen erfolglos geblieben worden waren. Dennoch deuteten diese Versuche darauf hin, dass die potentielle Wechselwirkung zwischen den Komponenten sehr schwach und transienter Natur sind und/oder die Anwesenheit von aminoacylierter tRNA^{Glu} voraussetzen.

3.11.1 Co-Immunopräzipitationsanalysen mit zellfreien *Escherichia coli* Extrakten

Hierbei sollte ein *E. coli* Zellextrakt mit dem Anti-GluTR Serum inkubiert und die Antigen-Antikörper Komplexe durch Bindung an Protein A Sepharose isoliert werden. Nach der Auftrennung der isolierten Proteine durch SDS-PAGE und dem Transfer auf eine PVDF-Membran mittels Elektro-Blotting wurden die Proteine auf der PVDF-Membran mit dem Anti-GSA-AM Serum inkubiert.

Zunächst mußten die polyklonalen Antikörper auf ihre Spezifität untersucht werden. Hierzu wurden das Kaninchen Anti-GluTR- und das Kaninchen Anti-GSA-AM-Serum gegen *E. coli* Zellextrakte und die gereinigten Enzyme titriert (Abb. 34).

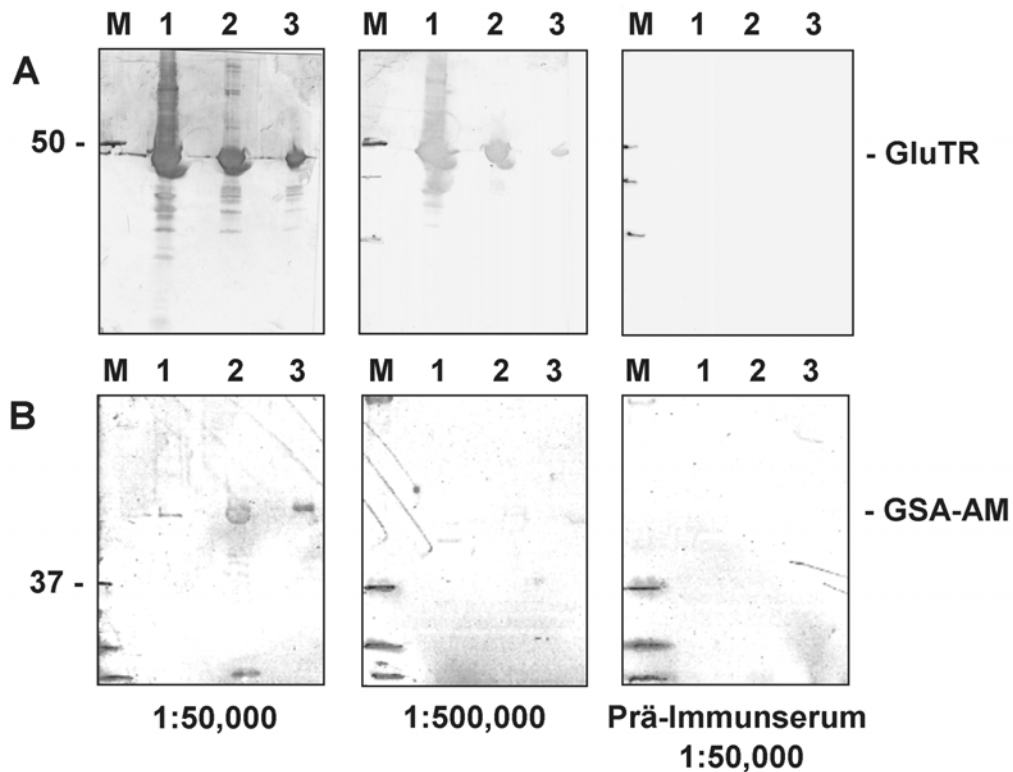


Abbildung 34: Western-Blot Analyse der Titration der produzierten Kaninchen Antikörper gegen *E. coli* GluTR (A) und *E. coli* GSA-AM (B). In Bahn A 1 und B 1 ist ein *E. coli* Zellextrakt getrennt worden. In Bahn A 2 und A 3 sind 2 und 0.2 µg gereinigte rekombinante *E. coli* GluTR elektrophoretisch getrennt worden. In Bahn B 2 und B 3 sind 2 und 0.2 µg gereinigte rekombinante *E. coli* GSA-AM geladen worden. Als Negativkontrolle dienten die Prä-Immunsera der jeweiligen Kaninchen (jeweils rechts). Bahn M zeigt den Molekulargewichtsstandard, die relative molekulare Masse ($\times 10^3$) ist angegeben. Die Antikörper enthaltenden Sera sind in den angegebenen Verdünnungen 1:50,000 (links) und 1:500,000 (Mitte) benutzt worden. Die primäre Antigen-Antikörper-Wechselwirkung wurde durch einen zweiten, gegen Kaninchen IgG gerichteten Enzym-gekoppelten Antikörper sichtbar gemacht.

Es ist deutlich zu erkennen, dass die Anti-GluTR Antikörper auch unspezifisch mit anderen *E. coli* Proteinen reagierten (Abb. 34, A 1, A 2 und A 3). Im Gegensatz hierzu reagierten die Anti-GSA-AM Antikörper spezifisch nur mit einem Protein des *E. coli* Zellextraktes (Abb. 34, B 1) bzw. der gereinigten *E. coli* GSA-AM (Abb. 34, B 2 und B 3). Beide Prä-Immunsera reagierten nicht mit den *E. coli* Proteinen.

Vor der Verwendung in Co-Immunopräzipitationsexperimenten mußten die unspezifisch reagierenden Antikörper des Anti-GluTR Serums durch Behandlung mit dem Proteinextrakt eines *E. coli hemA⁻* Stammes entfernt werden (Abb. 35).

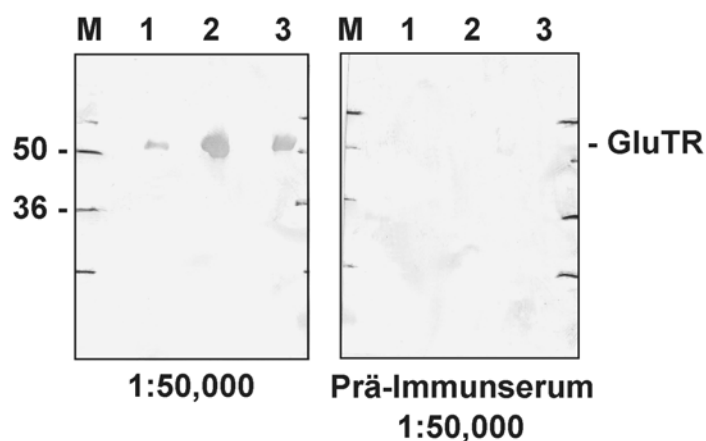


Abbildung 35: Western Blot Analyse der Spezifität des Anti-GluTR Serums nach der Entfernung unspezifisch reagierender Antikörper. In Bahn 1 ist ein *E. coli* Zellextrakt getrennt worden. In Bahn 2 und 3 sind 3 und 0.3 µg gereinigte rekombinante *E. coli* GluTR elektrophoretisch getrennt worden. Bahn M zeigt den Molekulargewichtsstandard, die relative molekulare Masse ($\times 10^3$) ist angegeben. Die Experimente wurden analog zu Abb. 34 durchgeführt.

Wie aus Abbildung 35 hervorgeht konnte die Spezifität des Anti-GluTR Serums wesentlich verbessert werden. Selbst bei einer Serumverdünnung von 1:50,000 reagierten die polyklonalen Antikörper nur mit einem Protein der M_r von ca. 50,000 des *E. coli* Zellextraktes.

Nun wurde ein *E. coli* Zellextrakt mit dem gereinigten Anti-GluTR Serum inkubiert und die Antigen-Antikörper Komplexe durch Bindung an Protein A Sepharose isoliert. Der Western Blot wurde mit Anti-GSA-AM Antikörpern entwickelt (Abb. 36).

Hierdurch konnte auf dem Blot *E. coli* GSA-AM detektiert werden (Abb. 36, Bahn 2 und 3). Der aus dem Zellextrakt mit dem Anti-GluTR Serum isolierte Immunkomplex enthielt also neben der GluTR auch noch die GSA-AM, was nur durch eine direkte Interaktion der beiden Enzyme erklärbar ist.

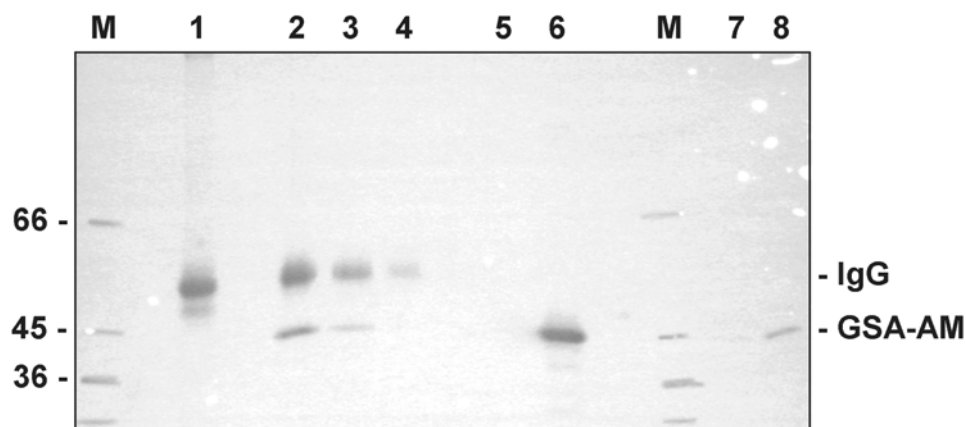


Abbildung 36: Western Blot Analyse der *in vivo* Co-Immunopräzipitation von *E. coli* GSA-AM mit *E. coli* GluTR aus einem *E. coli* BL21(DE3)-Zellextrakt. Gezeigt ist: Bahn 1, Negativkontrolle mit Prä-Immunsereum. In Bahn 2, 3 und 4 sind aus dem Zellextrakt mit Anti-GluTR Serum isolierte Immunkomplexe mit fallenden Anti-GluTR Serum-Konzentrationen getrennt worden. In Bahn 5 sind 0.2 µg gereinigte rekombinante *E. coli* GluTR, in Bahn 6 0.2 µg gereinigte rekombinante *E. coli* GSA-AM und in Bahn 7 und 8 ein *E. coli* Zellextrakt geladen worden. Bahn M zeigt den Molekulargewichtsstandard, die relative molekulare Masse ($\times 10^3$) ist angegeben. Der Nachweis der mit Anti-GluTR Antikörpern co-immunopräzipitierten GSA-AM wurde durch Entwicklung des Blots mit Anti-GSA-AM Antikörpern und deren Visualisierung über einen zweiten, enzymgekoppelten Antikörper geführt. Zu sehen ist daher einerseits immunopräzipitierte GSA-AM. Andererseits sind auch die IgGs des zur Präzipitation verwendeten Anti-GluTR Serums zu sehen, da der zweite zum Nachweis benutzte Antikörper Kaninchen IgG erkennt.

Der analoge Versuch wurde parallel auch mit einem *E. coli* BL21(DE3)-Zellextrakt, für den die Zellen aus der stationären Wachstumsphase stammten, durchgeführt. Im Gegensatz zu dem Zellextrakt von Zellen aus der logarithmischen Wachstumsphase konnte hierbei keine Co-Immunopräzipitation von GluTR und GSA-AM beobachtet werden.

3.11.2 *In vitro* Co-Immunopräzipitationsstudien

Nachdem die Wechselwirkung der GluTR mit der GSA-AM *in vivo* gezeigt werden konnte, sollten anschließend Experimente zur *in vitro* Co-Immunopräzipitation durchgeführt werden. Zu diesem Zweck wurden Ansätze der *E. coli* GluTR mit der *E. coli* GSA-AM in An- und Abwesenheit der jeweiligen Cofaktoren bzw. Substrate und ein Ansatz der zusätzlich noch die *E. coli* GluRS zusammen mit tRNA^{Glu}, Glutamat und ATP enthielt untersucht (Abb. 37).

1	2	3	4	5	6	M	7	8	9	
-	-	-	-	+	+	-	+	-	-	GluRS
+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	GluTR
+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	GSA-AM
-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	Glutamat
-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	tRNA^{Glu}
-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	ATP
-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	NADPH
-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	PLP
10	2	10	2	10	2	-	-	-	-	Vorinkubationszeit (min)
4	37	4	37	4	37	-	-	-	-	Temperatur (° C)

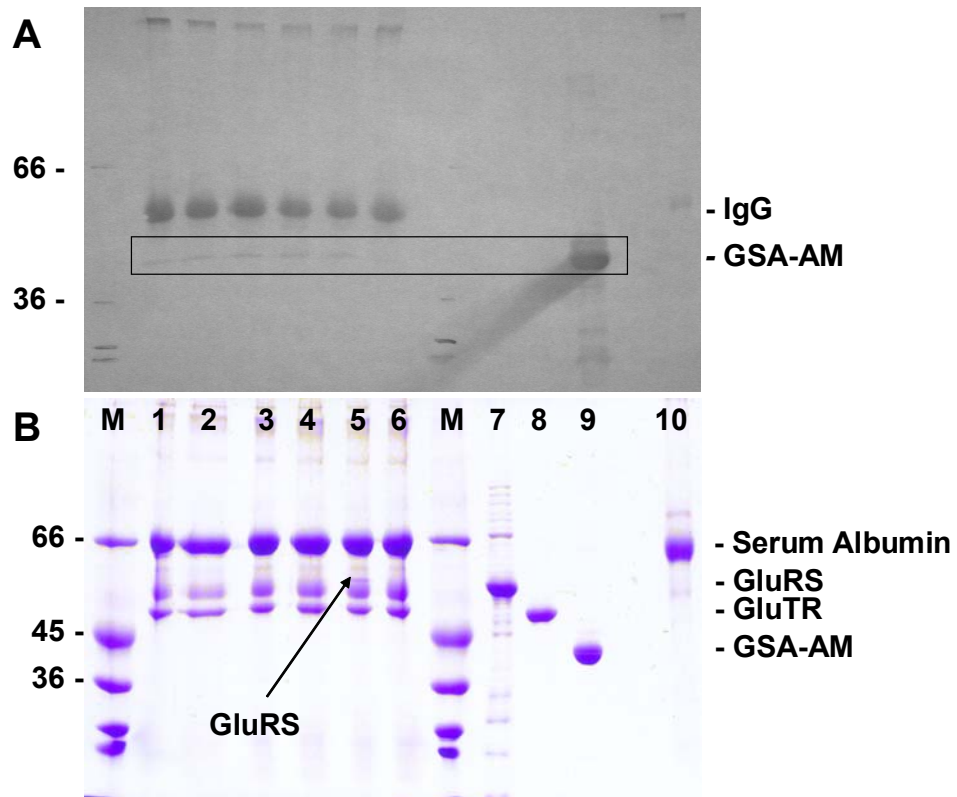


Abbildung 37: Co-Immunopräzipitationsexperimente mit rekombinanter, gereinigter *E. coli* GluRS, GluTR und GSA-AM. Die Enzyme wurden, wo angegeben, mit den entsprechenden Zusätzen inkubiert und mit Anti-GluTR Antikörpern, gekoppelt an mit Protein A beschichtete Sepharose, immunopräzipitiert. Gefällte Proteine wurden mittels SDS-PAGE getrennt. Gezeigt ist unter A ein Westernblot mit Anti-GSA-AM Antikörpern, visualisiert durch einen zweiten, enzymgekoppelten Antikörper. Unter B ist ein mit Coomassie Blau gefärbtes SDS Gel des identischen Experiments gezeigt. Die Ansätze in den Bahnen 1, 3 und 5 wurden für 10 min bei 4 °C und die Ansätze in den Bahnen 2, 4 und 6 für 2 min bei 37 °C vorinkubiert. Auf Bahn 10 ist eine Negativkontrolle des Ansatzes von Bahn 5 mit Prä-Immuns serum zu sehen.

Auffallend ist, dass bei allen Ansätzen die GSA-AM mit der GluTR co-immunopräzipitiert werden konnte. Dies deutet darauf hin, dass sich nachweisbare Populationen von GluTR/GSA-AM Komplexen in An- und Abwesenheit der Cofaktoren bzw. Substrate ausbilden können. In Abbildung 37 B ist zu erkennen, dass im Coomassie Brilliant Blau gefärbten SDS-PAGE Gel die immunopräzipitierte GluTR vorhanden ist, eine äquimolare Menge der GSA-AM aber fehlt, die Komplexe zwischen beiden Enzymen also nicht in einer 1:1 Stöchiometrie ausgebildet wurden. Besonders interessant ist die in Abbildung 37 in Bahn 5 B auftretende Bande, die die gleiche M_r wie die in Bahn 7 aufgetragene GluRS aufweist. Dies könnte darauf hindeuten, dass auch die GluRS zusammen mit der GSA-AM und der GluTR in dem aus dem *in vitro* Ansatz isolierten Immunkomplex vorhanden ist, diese drei Enzyme also einen transienten ternären Komplex ausbilden.

Versuche heterologe Komplexe von *M. kandleri* GluTR und *E. coli* GSA-AM durch Co-Immunopräzipitation zu isolieren, zeigten, dass die Enzyme aus diesen beiden Organismen unter den vorliegenden Versuchsbedingungen keine nachweisbare Wechselwirkung miteinander eingingen. Auch die *E. coli* GluTR-Variante A338Stop, die keine Dimerisierungsdomäne mehr besitzt und als Monomer vorliegt, konnte nicht mit der *E. coli* GSA-AM co-immunopräzipitiert werden. Dies deutet darauf hin, dass nur die dimere Form der *E. coli* GluTR mit der GSA-AM wechselwirken kann.

3.12 Kristallisation der *Escherichia coli* Glutamyl-tRNA Reduktase

Die Strukturaufklärung wurde mittels Röntgenstrukturanalyse von *E. coli* GluTR angestrebt. Dazu sollten Proteinkristalle gewonnen werden. Es wurden Kristallisationsansätze mit den Crystal Screens I und II, Crystal Screen Lite, MembFac und Cryo Screen (Hampton Research, USA) durchgeführt (Tab. 15).

Tabelle 15: Kristallisationsansätze

	1	2	3
GluTR WT	+	-	-
GluTR C50S	-	+	-
GluTR C50/74/170S	-	-	+
GSA-AM	-	+	+
NADPH	+	+	+
PLP	-	+	+
Glutamycin	-	+	+
Gabaculin	-	-	+
Crystall Screen I	+	+	+
Crystall Screen II	+	+	+
Crystall Screen Lite	+	+	-
MembFac	-	+	-
Cryo Screen	-	+	-
4 °C	+	+	+
20 °C	+	+	-

In keinem der ca. 900 Kristallisationsansätze war Kristallwachstum beobachtbar. Es wurde festgestellt, dass 2 Wochen nach dem Ansetzen der Kristallisationsversuche in ca. 95 % der Ansätze Protein ausgefallen war. Aufgrund der Instabilität der *E. coli* GluTR in Lösung (siehe 3.5.3) wurde vermutet, dass die Aggregationsneigung des Enzyms eine Kristallisation verhinderte.

4 Zusammenfassung

Escherichia coli Glutamyl-tRNA Reduktase katalysiert im Rahmen der Tetrapyrrolbiosynthese die NADPH-abhängige Reduktion eines tRNA-gebundenen Glutamats zu Glutamat-1-semialdehyd. In der vorliegenden Arbeit gelang es erstmals das Enzym rekombinant bis zur apparenten Homogenität darzustellen. Dazu wurde eine experimentelle Strategie entworfen, die auf der Renaturierung des Proteins aus Einschlusskörpern basiert. Lösliches Enzym bildete die Basis für eine biochemische Charakterisierung. So wurde eine spezifische Aktivität von $0.47 \mu\text{mol min}^{-1} \text{mg}^{-1}$ mit *E. coli* Glu-tRNA^{Glu} als Substrat für das dimere Enzym bestimmt.

Die in der Diplomarbeit begonnene Aufklärung des Enzymmechanismus, der von einem nukleophilen Angriff der Sulfhydrylgruppe eines Cysteinrestes des Enzyms auf die aktivierte α -Carboxylgruppe des tRNA-gebundenen Glutamats unter Bildung eines Thioesters ausgeht, wurde fortgesetzt. So konnte erstmals das zentrale Thioester-Zwischenprodukt direkt experimentell nachgewiesen werden. Durch Mutagenesestudien konnte der hoch konservierte Cystein-Rest 50 als Nukleophil des aktiven Zentrums identifiziert werden. Die Enzymreaktion wird dann durch den direkten Hydridtransfer von NADPH auf den reaktiven Thioester unter Bildung von GSA beendet. *E. coli* GluTR besitzt in Abwesenheit des reduzierenden Cofaktors NADPH eine Esterase-Aktivität, die das Substrat Glu-tRNA^{Glu} zu Glutamat und tRNA^{Glu} hydrolysiert.

Basierend auf dem Modell des aktiven Zentrums wurde die Bedeutung des konservierten Arginin-Rests 52 untersucht. Durch kinetische Analysen mit den GluTR-Varianten R52Q und R52K in Kombination mit dem artifiziellen Substrat Gln-tRNA^{Glu} konnte die zentrale Rolle von Arginin 52 für eine richtige Positionierung des Substrates und für die Differenzierung zwischen Glutamat und Glutamin nachgewiesen werden.

Der Vergleich von Enzymkinetiken mit *in vitro* synthetisierter, unmodifizierter Glu-tRNA^{Glu} und modifizierter Glu-tRNA^{Glu} zeigten, dass die posttranskriptionalen Modifikationen der tRNA keinen Einfluß auf die Erkennung durch die GluTR haben.

Die Konkurrenz der GluTR mit dem häufigsten zellulären Protein in *E. coli*, EF-Tu, als auch die chemisch labile Natur des GSA erfordern eine Wechselwirkung der beteiligten Enzyme im Rahmen eines „Metabolic Channeling“. Durch Co-Immunopräzipitation konnten direkte Protein-Protein-Wechselwirkungen von *E. coli* GluRS, GluTR und GSA-AM nachgewiesen werden.

Zusammengefaßt, konnten neue Erkenntnisse zur Funktion der GluTR aus *E. coli* und ihrer Wechselwirkung mit anderen Enzymen des Tetrapyrrolbiosyntheseweges gewonnen werden, die in Zukunft im Rahmen einer Struktur-Funktions-Analyse auf atomarer Ebene vertieft werden sollen.

5 Ausblick

Folgende Untersuchungen leiten sich von den Ergebnissen dieser Arbeit ab:

- Entwicklung von farbaktiven GluTR-Esterasesubstraten, die eine leichte und direkte spektroskopische Aktivitätsbestimmung für ein Hochdurchsatzscreening nach Inhibitoren erlauben. Dies könnte der erste Schritt zu hochselektiven Antibiotika und Pflanzenschutzmitteln sein, da die GluTR im Menschen nicht vorkommt.
- Darstellung des misacylierten Substrates Glu-tRNA^{Gln} zur Bestimmung des Beitrages des tRNA-Anteils bei der Substraterkennung.
- Produktion von Antikörpern gegen die *E. coli* GluRS und weitere Tetrapyrrolbiosynthese Enzyme, um weitere potentielle Wechselwirkungspartner zu identifizieren. Damit ergeben sich auch Möglichkeiten zur Analyse zellulärer Co-Lokalisation mittels mikroskopischer Methoden
- Kristallisation der *E. coli* GluTR in Gegenwart von Detergenzien oder Lipiddoppelschichten um die Aggregation des Enzyms zu verhindern.

6 Literatur

- Abriola, D. P., Mackerell, A. D. & Pietruszko, R. (1990). Correlation of loss of activity of human aldehyde dehydrogenase with reaction of bromoacetophenone with glutamic acid-268 and cysteine-302 residues. Partial-sites reactivity of aldehyde dehydrogenase. *Biochem. J.* **266**, 179-187.
- Aull, J. L., Allen, R. L. & Wilson, J. F. (1979). The effects of platinum complexes on seven enzymes. *Biochim. Biophys. Acta* **571**, 352-358.
- Avissar, Y. & Beale, S. (1989). Identification of the enzymatic basis for deltaamino-levulinic acid auxotrophy in a hemA mutant of *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**, 2919-2924.
- Beale, S. & Castelfranco, P. (1973). [¹⁴C] incorporation from exogenous compounds into 2-aminolevulinic acid by greening cucumber cotyledons. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **52**, 143-149.
- Beale, S., Gough, S. & Granick, S. (1975). Biosynthesis of 2-aminolevulinic acid from the intact carbon skeleton of glutamic acid in greening barley. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **72**, 2719-2723.
- Berchtold, H., Reshetnikova, L., Reiser, C. O. A., Schirmer, N. K., Sprinzl, M. & Hilgenfeld, R. (1993). Crystal structure of active elongation factor Tu reveals major domain rearrangements. *Nature* **365**, 126-132.
- Boschi-Muller, S. & Branlant, G. (1999). The active site of phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is not designed to increase the nucleophilicity of a serine residue. *Arch. Biochem. Biophys.* **363**, 259-266.
- Borel, F., Hartlein, M. & Leberman, R. (1993). *In vivo* overexpression and purification of *Escherichia coli* tRNA(ser). *FEBS Lett.* **324**, 162-6.

- Breton, R., Watson, D., Yagushi, M. & Lapointe, J. (1990). Glutamyl-tRNA synthetase of *Bacillus subtilis* 168t and of *Bacillus stearothermophilus*. *J. Biol. Chem.* **265**, 18248–18255.
- Brisson, A., Brun, Y.V., Bell, A.W., Roy, P.H. & Lapointe, J. (1989). Overproduction & domain structure of the glutamyl-tRNA synthetase of *Escherichia coli*. *Biochem. Cell. Biol.* **67**, 404-10.
- Carugo, O. & Argos, P. (1997). NADP-dependent enzymes. II: Evolution of the mono- and dinucleotide binding domains. *Proteins* **28**, 29-40.
- Chapman, K. T., Kopka, J. E. & Hagmann, W. K. (1993). Inhibition of matrix metalloproteinases by N-carboxyalkyl peptides. *J. Med. Chem.* **36**, 4293-4301.
- Chen, M.-W., Jahn, D., O'Neill, G. & Söll, D. (1990). Purification of the glutamyl-tRNA reductase from *Chlamydomonas reinhardtii* involved in δ -aminolevulinic acid formation during chlorophyll biosynthesis. *J. Biol. Chem.* **265**, 4058-4063.
- Chen, W., Wright, L., Lee, S., Cosloy, S. D. & Russell, C. S. (1996). Expression of Glutamyl-tRNA reductase in *Escherichia coli*. *Biochem. Biophys. Acta* **1309**, 109-121.
- Clark, B. F. C. & Nyborg, J. (1997). The ternary complex of EF-Tu and its role in protein biosynthesis. *Curr. Opin. Struc. Biol.* **7**, 110-116.
- Contestabile, R., Jenn, T., Akhtar, M., Gani, D. & John, R. A. (2000) Reactions of glutamate 1-semialdehyde aminomutase with R- and S-enantiomers of a novel, mechanism-based inhibitor, 2,3-diaminopropyl sulfate. *Biochemistry* **39**, 3091-6.
- De Bernandez Clark, E., Schwarz, E. & Rudolph, R. (1999). Inhibition of aggregation side reactions during *in vitro* protein folding. *Methods Enzymol.* **309**, 217-236.
- Dower, W. J., Miller, J. F. & Ragsdale, C. W. (1988). High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucl. Acid. Res.* **16**, 6127-6145.

- Eiler, S., Dock-Bregeon, A., Moulinier, L., Thierry, J. C. & Moras, D. (1999). Synthesis of aspartyl-tRNA(Asp) in *Escherichia coli* – a snapshot of the second step. *EMBO J.* **18**, 6532-6541.
- Eriani, G., Delarue, M., Poch, O., Gangloff, J. & Moras, D. (1990). Partition of tRNA synthetases into two classes based on mutually exclusive sets of sequence motifs. *Nature*, **347** (6289), 203-6.
- Frankenberg, N., Erskine, P. T., Cooper, J. B., Shoolingin-Jordan, P. M., Jahn, D. & Heinz, D. W. (1999 a). High resolution crystal structure of a Mg^{2+} -dependent porphobilinogen synthase. *J. Mol. Biol.* **289**, 591-602.
- Frankenberg, N., Jahn, D. & Heinz, D. W. (1999 b). Production, purification and characterization of a Mg^{2+} -responsive porphobilinogen synthase from *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* **38**, 13968-13975.
- Frankenberg, N., Jahn, D. & Jaffe, E. K. (1999 c). *Pseudomonas aeruginosa* contains a novel type V porphobilinogen synthase with no required catalytic metal ions. *Biochemistry* **38**, 13976-13982.
- Frankenberg, N., Moser, J. & Jahn, D. (2003). Bacterial heme biosynthesis and its biotechnological application. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, im Druck.
- Freist, W., Gauss, D., Söll, D. & Lapointe, J. (1997). Glutamyl-tRNA synthetase. *Biol. Chem.* **378**, 1313-29.
- Gill, S. & von Hippel, P. (1989). Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data. *Anal. Biochem.* **182**, 319-26.
- Habenicht, A. (1997). The non-phosphorylating glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase: biochemistry, structure, occurrence and evolution. *Biol. Chem.* **378**, 1413-1419.

- Haile, D. J., Rouault, T. A., Harford, J. B. & Klausner, R. D. (1990). The inhibition of the iron responsive element RNA-Protein interaction by heme does not mimic *in vivo* iron regulation. *J. biol. Chem.* **265**, 12786-12789.
- Hanahan, D. (1983). Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. *J. Mol. Biol.* **166**, 557-80.
- Hempel, J. D. & Pietruszko, R. (1981). Selective chemical modification of human liver aldehyde dehydrogenase E1 and E2 by iodacetamide. *J. Biol. Chem.* **256**, 10889-10896.
- Hennig, M., Grimm, B., Contestabile, R., John, R., & Jansonius, J. (1997). Crystal structure of glutamate-1-semialdehyde aminomutase: an α_2 -dimeric vitamin B₆-dependent enzyme with asymmetry in structure & active site reactivity. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **94**, 4866-4871
- Hoben, P. & Söll, D. (1985) Glutamyl-tRNA synthetase of *Escherichia coli*. *Methods Enzymol.* **113**, 55-9.
- Hoober, J., Kahn, A., Ash, D., Gough, S., & Kannangara, C. (1988). Biosynthesis of delta-aminolevulinate in greening barley leaves. IX. Structure of the substrate, mode of gabaculine inhibition, & the catalytic mechanism of glutamate 1-semialdehyde aminotransferase. *Carlsberg. Res. Commun.* **53**, 11-25.
- Huang, D.-D., & Wang, W.-Y. (1986). Chlorophyll biosynthesis in *Chlamydomonas* starts with the formation of glutamyl-tRNA. *J. Biol. Chem.* **261**, 13451-13455.
- Ilag, L., Jahn, D., Eggertson, G. & Söll, D. (1991). The *Escherichia coli* *hemL* gene encodes glutamate-1-semialdehyde aminotransferase. *J. Bacteriol.* **173**, 3408-3413.
- Ilag, L. & Jahn, D. (1992). Activity & spectroscopic properties of the *Escherichia coli* glutamate 1-semialdehyde aminotransferase & the putative active site mutant K265R. *Biochemistry* **31**, 7143-7151.

- Ishida, T., Yu, L., Akutsu, H., Ozawa, K., Kawanishi, S., Seto, A., Inubushi, T. & Sano, S. (1998). A primitive pathway of porphyrin biosynthesis and enzymology in *Desulfovibrio vulgaris*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **95** (5), 4853–4858.
- Jahn, D., Chen, M.-W. & Söll, D. (1991). Purification & functional characterization of glutamate-1-semialdehyde aminotransferase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Biol. Chem.* **266**, 161-167.
- Jahn, D., Michelsen, U. & Söll, D. (1991). Two glutamyl-tRNA reductase activities in *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **266**, 2542–2548.
- Jahn, D., Verkamp, E. & Söll, D. (1992). Glutamyl-transfer RNA: a precursor of heme & chlorophyll biosynthesis. *Trends Biochem. Sci.* **17** (6), 215-219.
- Jahn, D. (1992). Complex formation between glutamyl-tRNA synthetase and glutamyl-tRNA reductase during the tRNA-dependent synthesis of 5-aminolevulinic acid in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.* **314**, 77-80.
- Jahn, D., Hungerer, C. & Troup, B. (1996). Ungewöhnliche Wege und umweltregulierte Gene der bakteriellen Hämbiosynthese. *Naturwissenschaften*, **83**, 389-400.
- Johnson, W.C. (1990). Protein secondary structure and circular dichroism: a practical guide. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **7**, 205-214.
- Jordan, P. (1991). Biosynthesis of tetrapyrroles. In *New comprehensive biochemistry*, vol. **19**. Elsevier, Amsterdam, NL.
- Kannangara, C., Gough, S., Oliver, R. & Rasmussen, S. (1984). Biosynthesis of delta-aminolevulinate in greening barley leaves. VI. Activation of glutamate by ligation to RNA. *Carlsberg Res. Commun.* **49**, 417-437.

- Kannangara, C., Gough, S., Bruyant, P., Hooper, J., Kahn, A. & von Wettstein, D. (1988). tRNA^{Glu} as a cofactor in delta-aminolevulinate biosynthesis: steps that regulate chlorophyll synthesis. *Trends. Biochem. Science* **13**, 139–143.
- Kelly, S. & Price, N. (1997). The application of circular dichroism to studies of protein folding & unfolding. *Biochim. Biophys. Acta*, **1338**, 161-185.
- Kikuchi, G., Kumar, A., Talmage, P. & Shemin, D. (1958). The enzymatic synthesis of δ -aminolevulinic acid. *J. Biol. Chem.* **233**, 1214-1219.
- Konopliiskaia, K. L., Kuz'mina, G. I., Grigor'eva, M. V. & Pozniakova, T. N. (1984). Effect of SH-reagents on aldehyde dehydrogenase activity of the rat liver. *Ukr. Biokhim Zh.* **56**, 628-633.
- Laemmli, U. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-85.
- Lapointe, J. & Söll, D. (1972). Glutamyl-tRNA synthetase of *Escherichia coli* : I. Purification and properties. *J. Biol. Chem.* **247**, 4966–4974.
- Larsen, J. E., Gerdes, K., Light, J. & Molin, S. (1984). Low-copy-number plasmid-cloning vectors amplifiable by derepression of an inserted foreign promoter. *Gene* **28**, 45-54.
- Li, J. M., Brathwaite, O., Cosloy, S. D. & Russell, C. S. (1989 a). 5-Aminolevulinic acid synthesis in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **171**, 2547-52
- Li, J. M., Russell, C. S. & Cosloy, S. D. (1989 b). Cloning and structure of the *hemA* gene of *Escherichia coli* K-12. *Gene* **82**, 209-17.
- Lin, S. X., Brisson, A., Liu, J., Roy, P.H. & Lapointe, J. (1992) Higher specific activity of the *Escherichia coli* glutamyl-tRNA synthetase purified to homogeneity by a six-hour procedure. *Protein. Expr. Purif.* **3**, 71-4.

- Lorenz, S. (1998). Charakterisierung der Glutamyl-tRNA Reduktase aus *Escherichia coli*. Diplomarbeit, Universität Freiburg im Breisgau.
- Lüer, C. (2003). Struktur- und Funktionsanalyse der Glutamyl-tRNA Reduktase. Diplomarbeit, Technische Universität Braunschweig.
- Madore, E., Florentz, C., Giege, R., Sekine, S.-I., Yokoyama, S. & Lapointe, J. (1999). Effect of modified nucleotides on *Escherichia coli* tRNA^{Glu} structure and on its aminoacylation by glutamyl-tRNA synthetase. *Eur. J. Biochem.* **266**, 1128–1135.
- Maret, W., Jacob, C. & Fischer, E. H. (1999). Inhibitory sites in enzymes: zinc removal and reactivation by thionein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **96**, 1936-1940.
- May, B. K., Dogra, S. C., Sadlon, T. J., Bhasger, C. R., Cox, T. C. & Bottomley, S. S. (1995). Molecular regulation of heme biosynthesis in higher vertebrates. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* **51**, 1-51.
- Moser, J., Lorenz, S., Hubschwerlen, C., Rompf, A. & Jahn, D. (1999). *Methanopyrus k&leri* glutamyl-tRNA reductase. *J. Biol. Chem.* **274**, 30679-30685.
- Moser, J., Schubert, W.-D., Beier, V., Bringemeier, I., Jahn, D. & Heinz, D. W. (2001). V-shaped structure of glutamyl-tRNA reductase, the first enzyme of tRNA-dependent tetrapyrrole biosynthesis. *The EMBO Journal*, **20** (23), 6583-6590.
- Moser, J., Schubert, W. D., Heinz, D. W., Jahn, D. (2002). Structure and function of glutamyl-tRNA reductase involved in 5-aminolaevulinic acid formation. *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 579-84.
- Nagradova, N. K. & Schmalhausen, E. V. (1998). Catalytically active monomers of *E. coli* glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *Biochemistry* **63**, 504-515.
- Nakayashiki, T., Nishimura, K. & Inokuchi, H. (1995). Cloning and sequencing of a previously unidentified gene that is involved in the biosynthesis of heme in *Escherichia coli*. *Gene* **153**, 67-70.

- Nicholson A. W., Hall, C. C., Strycharz W. A. & Cooperman B. S. (1982). Photoaffinity labeling of *Escherichia coli* ribosomes by an aryl azide analogue of puromycin. Evidence for the functional site specificity of labeling. *Biochemistry* **16**, 3809-3817.
- Nissen, P., Kjeldgaard, S., Thirup, S., Clark, B. F. C. & Nyborg, J. (1996). The ternary complex of aminoacylated tRNA and EF-Tu-GTP. Recognition of a bond and a fold. *Biochimie* **78**, 921-933.
- Nureki, O., Vassylyev, D., Katayanagi, K., Shimizu, T., Sekine, S., Kigawa, T., Miyazawa, T., Yokoyama, S. & Morikawa, K. (1995). Architectures of class-defining & specific domains of glutamyl-tRNA synthetase. *Science* **267**, 1958-1965
- O'Neill, G. P., Chen, M. W. & Söll, D. (1989). delta-Aminolevulinic acid biosynthesis in *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* involves formation of glutamyl-tRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* **51**, 255-9.
- O'Neill, G. P., Jahn, D. & Söll, D. (1991). In *Subcellular Biochemistry*, vol.17, 235-264, Plenum Press, New York, USA.
- Perona, J., Swanson, R., Steitz, T. & Söll, D. (1988). Overproduktion & purification of *Escherichia coli* tRNA(2Gln) & its use in crystallization of the glutamyl-tRNA synthetase-tRNA(Gln) complex. *J. Mol. Biol.* **202**, 121-6.
- Perozich, J., Nicholas, H., Wang, B. C., Lindahl, R. & Hempel, J. (1999). Relationships within the aldehyde dehydrogenase extended family. *Protein Sci.* **8**, 137-146.
- Peterson, D., Schön, A. & Söll, D. (1988). The nucleotide sequences of barely cytoplasmatic glutamate transfer RNAs and structural features essential for formation of 2-aminolevulinic acid. *Plant. Mol. Biol.* **11**, 293–299.

- Pontoppidan, B. & Kannangara, C. G. (1994). Purification and partial characterisation of barley glutamyl-tRNA reductase, the enzyme that directs glutamate to chlorophyll biosynthesis. *Eur. J. Biochem.* **255**, 529-537.
- Randau, L. (2002). Erkennung des tRNA Substrats durch die Glutamy-tRNA Reduktase. Diplomarbeit. Technische Universität Braunschweig.
- Rieble, S. & Beale, S. I. (1991). Purification of glutamyl-tRNA reductase from *Synechocystis* sp. PCC 6803. *J. Biol. Chem.* **15**, 9740-9745.
- Righetti, P., Gianazza, E., Gelfi, C. & Chairi, M. (1990). In *Gel electrophoresis of proteins: a practical approach*. 2 edition, Oxford University Press.
- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (1989). In *Molecular cloning: A laboratory Manual*. Cold Spring Harbor Laboratory.
- Schauer, S., Chaturvedi, S., R&au, L., Moser, J., Kitabatake, M., Lorenz, S., Verkamp, E., Schubert, W.-D., Nakayashiki, T., Murai, M., Wall, K., Thomann, H.U., Heinz, D.W., Inokuchi, H., Söll, D. & Jahn, D. (2002). *Escherichia coli* glutamyl-tRNA reductase. *J. Biol. Chem.* **277**, 48657-48663.
- Schauer, S., Lüer, C. & Moser, J. (2003). Large scale production of biologically active *Escherichia coli* glutamyl-tRNA reductase from inclusion bodies. *Protein. Expr. Purif.* **31**, 271-275.
- Schobert, M. & Jahn, D. (2002). Regulation of Heme Biosynthesis in Non-phototrophic Bacteria. *J. Mol. Microbiol.* **4**, 287-294.
- Schön, A., Krupp, G., Berry-Lowe, S., Kannangara, C., Gough, S. & Söll, D. (1986). The RNA required in the first step of chlorophyll biosynthesis is a chloroplast glutamate tRNA. *Nature*, **322**, 281-284.

- Schubert, W. D., Moser, J., Schauer, S., Heinz, D. W. & Jahn, D. (2002). Structure and function of glutamyl-tRNA reductase, the first enzyme of tetrapyrrole biosynthesis in plants and prokaryotes. *Photosynthesis Research* **74**, 205-215.
- Sekine, S.-I., Nureki, O., Sakamoto, K., Niimi, T., Tateno, M., Gō, M., Kohno, T., Brisson, A., Lapointe, J., & Yokoyama, S. (1996). Major identity determinants in the “augmented D helix” of tRNA^{Glu} from *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* **256**, 685-700.
- Sekine, S.-I., Nureki, O., Tateno, M. & Yokoyama, S. (1999). The identity determinants required for the discrimination between tRNA^{Glu} and tRNA^{Asp} by glutamyl-tRNA synthetase from *Escherichia coli*. *Eur. J. Biochem.* **261**, 354–360.
- Sekine, S.-I., Nureki, O., Shimada, A., Vassilyev, D. & Yokoyama, S. (2001). Structural basis for anticodon recognition by discriminating glutamyl-tRNA synthetase. *Nat. Struct. Biol.* **8** (3), 203-206.
- Shemin, D. & Russel, C. (1953). 5-aminolevulinic acid, its role in the biosynthesis of porphyrins and purines. *J. Am. Chem. Soc.* **75**, 4873-4875.
- Siegel, L. M. & Monty, K. J. (1966). Determination of molecular weights and frictional ratios of proteins in impure systems by use of gel filtration and density gradient centrifugation. Application to crude preparations of sulfite and hydroxylamine reductases. *Biochem. Biophys. Acta* **112**, 346-363.
- Smith, M., Grimm, B., Kannangara, C., & von Wettstein, D. (1991). Spectral kinetics of glutamate-1-semialdehyde aminomutase of *Synechococcus*. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **88**, 9775-9779
- Stange-Thomann, N., Thomann, U., Llyod, A., Lyman, H., & Söll, D. (1994). A point mutation in *Euglena gracilis* chloroplast tRNA^{Glu} uncouples protein and chlorophyll biosynthesis. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **91**, 7947-7951.

- Studier, F.W., Rosenberg, A.H., Dunn, J.J. & Dubendorff, J.W. (1990) Use of T7 RNA polymerase to direct expression of cloned genes. *Methods Enzymol.* **185**, 60-89
- Sylvers, L., Rogers, K., Shimizu, M., Ohtsuka, E., & Söll, D. (1993). A 2-thiouridine derivative in tRNA^{Glu} is a positive determinant for aminoacylation by *Escherichia coli* glutamyl-tRNA synthetase. *Biochemistry*, **32**, 3836-3841
- Verkamp, E. & Chelm, B. (1989). Isolation, nucleotide sequence, & preliminary characterization of the *Escherichia coli* K-12 *hemA* Gene. *J. Bacteriol.* **171**, 4728-4735.
- Verkamp, E., Jahn, M., Jahn, D., Kumar, A. & Söll, D. (1992). Glutamyl-tRNA reductase from *Escherichia coli* and *Synechocystis* 6803. *J. Biol. Chem.* **267**, 8275–8280.
- Vothknecht, U. C., Kannangara, C. G. & von Wettstein, D. (1996). Expression of catalytically active glutamyl-tRNA reductase in *Escherichia coli* as a fusion protein with glutathione S-transferase. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **93**, 9287-9291.
- Vothknecht, U. C., Kannangara, C. G. & von Wettstein, D. (1998). Barley glutamyl-tRNA reductase: mutations affecting h m inhibition and enzyme activity. *Phytochemistry* **47**, 513-519.
- Wang, L., Wilson, S. & Elliott, T. (1999 a). Conditional Stability of the HemA Protein (Glutamyl-tRNA Reductase) Regulates Heme Biosynthesis in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **181**, 1211-1219.
- Wang, L., Wilson, S. & Elliott, T. (1999 b). A Mutant HemA Protein with Positive Charge Close to the N-Terminus Is Stabilized against Heme-Regulated Proteolysis in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **181**, 6033-6041.
- Weygand-Dura evic, I., Schwob, E. & S ll, D. (1993). Acceptor end binding domain interactions ensure correct aminoacylation of transfer RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **90**, 2010-2014.

Willows, R., Kannangara, C. & Pontoppidan, B. (1995). Nucleotides of tRNA^{Glu} involved in recognition by barley chloroplast glutamyl-tRNA synthetase and glutamyl-tRNA reductase. *Biochim. Biophys. Acta*, **1263**, 228–234.

Danksagung

Bei Herrn Prof. Dr. D. Jahn möchte ich mich sehr für die Vergabe des interessanten Themas, seine motivierende und unterstützende Betreuung und die vielen hilfreichen Diskussionen bedanken.

Für die gute Zusammenarbeit und die freundliche Übernahme des Koreferats danke ich Herrn Prof. Dr. D. Heinz.

Großer Dank gilt Dr. Jürgen Moser für die hervorragende Einarbeitung in das Thema, die hilfreiche Unterstützung bei Problemen und die ständige Diskussionsbereitschaft. Außerdem möchte ich mich bei Corinna Lüer, Fernita Puspasari, Kalle Möbius und Lennart Randau für die aus der Zusammenarbeit mit ihnen geschaffenen synergistischen Effekte bedanken.

Bei der gesamten Arbeitsgruppe Jahn bedanke ich mich für die angenehme und kameradschaftliche Arbeitsatmosphäre.

Mein größter Dank gilt meiner lieben Frau Agnieszka, für ihre Unterstützung und unendliche Geduld, die sie auch trotz manch entgangener gemeinsamer Zeit, die ich im Labor verbrachte, nie verlor.

Lebenslauf

Vorname/Name	Stefan Schauer
Adresse	Döringstraße 4 38118 Braunschweig Tel.: 0531-8853708 E-mail: stefan.schauer@tu-bs.de
Persönliche Daten	geb. am 23.07.1974 in Stilzendorf Staatsangehörigkeit: deutsch Familienstand: verheiratet
Ausbildung	
1994 - 2000	Albert-Ludwigs-Universität Freiburg Fakultät für Chemie und Pharmazie Abschluss: Diplom-Chemiker
1986 - 1994	Markgräfler Gymnasium Müllheim Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Braunschweig, den 31.10.2003	